

**КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ
ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ:
ОТ ТЕОРИИ К ПРАКТИКЕ**

Наряду с традиционными методами вегетативного и генеративного размножения растений существует относительно новый метод клонального микро-размножения. Термином «клональное микро-размножение» называют массовое бесполое размножение растений в культуре клеток и тканей, при котором полученные растения генетически идентичны исходному экземпляру. В его основе лежит уникальная способность растительной клетки под экспериментальным воздействием дать начало целому растительному организму.

В исследованиях по культуре клеток и тканей можно выделить два направления: фундаментальное, связанное с углубленным исследованием биологии культивируемой клетки, особенностями ее дифференциации, роста, метаболизма, генетической и эпигенетической изменчивости, и прикладное, ставящее своей целью решение задач, возникающих в генетике, селекции, растениеводстве.

В настоящее время неоспоримо преимущество клонального микро-размножения перед традиционными методами вегетативного и генеративного размножения растений. Разнообразны области его применения: сельское и лесное хозяйство, цветоводство, медицинская и пищевая промышленность. В последнее время намечается тенденция к их расширению: сохранение редких и исчезающих видов растений (охрана окружающей среды). В мировой практике успешно применяется размножение растений в стерильной культуре с целью получения здорового посадочного материала.

Метод клонального микро-размножения взят на вооружение неслучайно – он экономически выгоден. Использование этого метода позволяет увеличить коэффициент размножения до 1 000 000 растений в год с одного маточного экземпляра, что в сотни тысяч раз больше по сравнению с обычными методами размножения. Так, из одного растения герберы, земляники, хризантемы, розы при размножении их посредством культуры ткани можно получить в год свыше 1 млн растений. Этот метод незаменим в селекции, так как сокращает сроки получения товарной продукции до 3–4 лет вместо 10–12 и позволяет получить здоровый посадочный материал, добиться ускоренного перехода от ювенильной фазы развития растения к репродуктивной, поддерживать рост растений круглый год, размножать растения, которые вегетативно не размножаются или размножаются с трудом, экономить площади теплиц, занятые под маточные растения, обеспечивает возможность круглогодичного размноже-

ния посадочного материала независимо от сезона года, продолжительную сохранность его с использованием минимальных объемов холодильных камер, устраняет риск, связанный с питомниководческой практикой (повреждение болезнями, вредителями, заморозками и др.).

Учитывая требования времени, клональное микроразмножение растений как одно из приоритетных направлений биотехнологии успешно развивается в ЦБС НАН Беларуси. С 1987 по 1997 г. координатором данного направления выступал его директор, член-корреспондент НАН Беларуси Е. А. Сидорович, с 1998 по 2009 г. – академик В. Н. Решетников. С 2009 г. по настоящее время работу по координации научных исследований в этой области осуществляет директор ЦБС НАН Беларуси доктор биологических наук В. В. Титок.

Регенерировать растение можно несколькими методами: 1) через активацию пазушных меристем; 2) индукцию соматического эмбриогенеза в каллусной культуре; 3) дифференциацию почек в каллусной культуре; 4) соматический эмбриогенез в ткани экспланта; 5) дифференциацию почек в ткани экспланта [1].

Регенеранты, полученные через каллусную культуру (из соматических зародышей или почек), как правило, вызывают сомнения в их генетической стабильности. К сожалению, в литературе до сих пор не существует четкого разграничения взглядов по вопросу, при каком методе регенерации можно получить генетически стабильный материал, а при каком – вариабельный. Однако, несмотря на всю сложность проблемы, касающейся качества регенерантов, полученных в культуре клеток и тканей, анализ литературного материала позволяет прийти к выводу, что генетически стабильный материал можно получить практически при любом методе регенерации, соблюдая строгий контроль морфогенеза, протекающего в культуре клеток и тканей, с помощью гистологического, кариологического и цитогенетического анализов регенерируемого материала. Наиболее высокий процент выхода генетически стабильных регенерантов можно обеспечить при использовании методов активации пазушных меристем, прямого соматического эмбриогенеза и образования побегов непосредственно из ткани экспланта, минуя стадию каллусообразования на питательной среде.

Следует отметить, что процесс микроразмножения начинается с изолирования экспланта, его стерилизации и посадки на питательную среду. Одна из первостепенных ролей в этом процессе принадлежит подбору стерилизующих соединений, эффективности их концентраций, продолжительности времени обработки с целью освобождения материала от инфекции и получения высокого выхода жизнеспособных эксплантов.

На основании анализа результатов экспериментальных исследований по изучению влияния стерилизующих соединений на выход жизнеспособных эксплантов интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, интродуцированных видов рододендронов мы пришли к выводу, что их выход зависит как от типа стерилизующего соединения, так и от сортовой

принадлежности растения, из которого вычленили эксплант. Оптимальными стерилизующими соединениями для эксплантов 14 интродуцированных сортов голубики высокой (*Bluecrop, Blueray, Dixi, Herbert, Rancocas, Covill, Earlyblue, Scammel, Atlantic, Concord, Tifblue, Woodart, Delite, Stanley*) следует считать 0,1%-ные растворы диацета, сулемы, азотнокислого серебра и 0,04%-ный раствор азотнокислой ртути. Для брусники обыкновенной (*Koralle, Masovia, Erntedank, Erntekrone, Erntezegen*) – 0,8%-ный раствор азотнокислого серебра при экспозиции 10 мин [2], для рододендронов – 0,1%-ный раствор азотнокислого серебра при экспозиции 5 мин [3].

Следующим фактором, оказывающим немаловажное значение на процесс клонального микроразмножения, является эксплант, его физиологическое состояние. Физиологическое состояние экспланта тесным образом связано с возрастом материнского растения, органом, из которого вычленен эксплант, а также со временем года. Стадия развития экспланта имеет первостепенное значение в регенерационном процессе, протекающем в культуре клеток и тканей. Анализ литературы по проблеме регенерационной способности ювенильных и зрелых эксплантов дает основание считать, что существуют два аспекта данной проблемы. С одной стороны, экспериментальный материал, полученный многочисленными исследователями, свидетельствует о высокой регенерационной способности, присущей ювенильным эксплантам [4], а с другой – зрелым [5]. Это убеждает нас в том, что только экспериментальным путем можно определить морфогенную способность того или иного экспланта независимо от наших знаний о его физиологическом состоянии.

Исследование регенерационной способности различных типов эксплантов у 14 интродуцированных сортов голубики высокой, 5 сортов брусники обыкновенной, 12 интродуцированных видов рододендронов, позволило определить тип экспланта, обладающего высокой регенерационной способностью, дающего максимальный выход растений-регенерантов, и рекомендовать его в качестве основного для культуры *in vitro*. Максимальным регенерационным потенциалом у исследованных сортов голубики высокой и рододендронов обладают ювенильные экспланты, у сортов брусники обыкновенной – зрелые [6, 7].

Еще один немаловажный фактор, играющий огромную роль в процессе клонального микроразмножения, – время года, в которое был вычленен эксплант. Особую остроту приобретает этот вопрос по отношению к интродуцированным сортам голубики высокой, брусники обыкновенной, интродуцированным видам рододендронов – растений, особенно богатых фенольными соединениями.

Как известно, при вычлениении экспланта происходит механическое повреждение тканей, сопровождаемое резким усилением интенсивности биосинтеза фенольных соединений и их ферментативным окислением, в результате которого образуются токсические соединения – хиноны, вызывающие некроз и гибель экспланта.

Вообще некротическая реакция рассматривается как защитная, сверхчувствительная функция, осуществляемая при помощи полифенольных соедине-

ний, так как продукты окисления фенолов создают на пути распространения инфекции хинонные барьеры, в результате чего возникают защитные некрозы. Однако такие защитные некрозы крайне нежелательны при введении стерильного экспланта в культуру *in vitro*. В связи с этим возникла необходимость в определении наиболее благоприятного времени года для отбора эксплантов, в течение которого некроз их будет минимальным.

Как показал анализ экспериментального материала, полученного для интродуцированных сортов голубики высокой, экспланты, вычлененные в различное время года, по-разному реагировали в культуре *in vitro*. Экспланты, отобранные в декабре, январе, феврале, быстро регенерировали побеги без образования каллуса. Экспланты, отобранные в другое время года, были неспособны к регенерации побегов [8].

С целью выяснения роли генотипа в процессе клонального микроразмножения нами также были проведены экспериментальные исследования. Анализ литературных данных и материалы собственных исследований заставили нас пересмотреть устоявшийся взгляд о влиянии генотипа на регенерацию. Не отрицая значительной роли генотипа в этом процессе, мы считаем, что если какой-либо вид растения или сорт не образует регенерантов в случае применения ряда модификаций питательных сред, это не может быть основанием для утверждения об отсутствии способности к регенерации у данного растения, так как она генетически детерминирована. Это лишь свидетельствует о неправильном сбалансировании компонентов питательной среды и других факторов, необходимых для регенерации того или другого вида растения или сорта. На наш взгляд, при соответствующей оптимизации состава питательных сред, условий культивирования, правильного отбора экспланта, можно вызвать морфогенез и регенерацию у любого генотипа, несмотря на всю сложность этих многофакторных процессов. Следовательно, нельзя недооценивать роль генотипа в клональном микроразмножении растений, равно как и преувеличивать его [9].

Основополагающим моментом в процессе клонального микроразмножения является регенерация растений, в основе которой лежат морфогенетические процессы, протекающие у эксплантов на всех уровнях организации: от отдельной клетки до целого органа. Немаловажное значение в регенерационном процессе имеет состав питательной среды. Исходя из этого нами были проведены исследования, касающиеся изучения регенерационного потенциала интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной в зависимости от содержания гормональных добавок в питательной среде, макро- и микроэлементов, витаминов, углеводов. Эксперименты были проведены на четырех типах питательных сред, представленных 18 различными модификациями. Из 18 исследованных модификаций питательных сред только две (WPW и Андерсена) могут быть использованы для клонального микроразмножения интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной [10].

Принимая во внимание то обстоятельство, что ризогенез у интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной происходил не только на среде для укоренения, содержащей ауксина, но и на среде для побегообразования, содержащей цитокинины, было интересно проследить, произойдет ли образование корней у регенерантов непосредственно в почвенном субстрате, минуя стадию укоренения на питательной среде.

Как показали результаты экспериментальных исследований, для укоренения регенерантов интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной следует использовать субстрат, состоящий из одной части перлита и одной части торфа. Образование корней у сортов голубики отмечено через 20 дней с момента посадки, у брусники – через 14 дней. Это позволило исключить одну из стадий в технологическом процессе *in vitro* – стадию укоренения на питательной среде [7].

В основе клонального микроразмножения растений лежат два принципиально разных этапа: *in vitro* и *ex vitro*.

На первом из них жизнедеятельность размножаемого материала происходит в стерильном замкнутом пространстве, на питательной среде в строго контролируемых условиях. После переноса регенерантов из условий *in vitro* начинается второй этап жизнедеятельности регенерантов в системе *ex vitro*, то есть в условиях оранжереи и открытого грунта, совершенно отличный от условий *in vitro*.

В условиях *ex vitro* растения вынуждены перейти с гетеротрофного типа питания на автотрофный, что сопряжено со структурной и функциональной перестройкой организма в новых условиях. Они должны приспособиться к изменяющимся, не свойственным им факторам внешней среды.

Переход растений от условий *in vitro* к условиям *ex vitro* в большинстве случаев является критическим и связан с гибелью растений. С нашей точки зрения, понять причину гибели растений при адаптации и предотвратить ее поможет сравнительный анализ структурно-функциональных особенностей регенерантов в условиях *in vitro* и *ex vitro*.

Исследования по изучению анатомии листа и водного стресса у растений сливы в условиях *in vitro* и *ex vitro*, показали, что потеря воды происходит в три раза быстрее у растений, полученных в культуре *in vitro*, по сравнению с растениями из теплицы [11]. В регенерантах, выращенных в асептических условиях, толщина палисадных клеток была значительно меньше по сравнению с регенерантами из оранжереи и открытого грунта.

Согласно результатам исследований Е. Sutter, R. W. Langhans [12], у пастьевых, культивируемых *in vitro*, листья лишены воскового налета, а работа устьиц не совершенна в силу нарушения механизма в их открывании и закрывании.

По данным Е. Bunning и Н. Sagromsky [13], J. W. O'Leary и G. N. Knecht [14], W. T. Penfound [15], **на развитие устьиц влияют такие факторы, как концентрация CO₂ в сосуде, водный режим и гормональный уровень.**

Устьица в условиях *in vitro* обычно находятся в открытом состоянии, чего нельзя сказать об устьицах в условиях *ex vitro*. Такое поведение устьиц

в условиях *in vitro*, с нашей точки зрения, вполне оправданно, так как в культуральных сосудах постоянно поддерживается высокий уровень относительной влажности (более 90%), температура и освещенность не подвержены перепадам, поскольку находятся в контролируемых условиях. Однако стоит изменить условия в культуральных сосудах, как последует реакция устьиц на изменения данных условий.

Реальным подтверждением этого являются результаты экспериментальных исследований, полученные P. Schoch et al. [16] в процессе изучения фотосинтеза и дыхания банана в системе *in vitro*. Авторы приходят к выводу, что при выращивании побегов банана в условиях *in vitro* устьица на листьях функционируют нормально, то есть реагируют на свет и закрываются при создании водного стресса. Следовательно, устьица реагируют адекватно тем условиям, в которых находится растение.

С этой точки зрения становится понятной неудача, постигшая некоторых исследователей, стремившихся искусственно вмешаться в четкую работу устьиц, соответствующую тем условиям, в которых они находятся. Например, использование антитранспирантов при переносе растений из условий *in vitro* в условия *ex vitro* способствовало снижению фотосинтеза, что привело к ухудшению роста растений [17].

Согласно исследованиям A. Fabbri и E. Sutter [18], структура листа земляники, сформированного в культуре *in vitro*, характеризовалась относительно тонкой листовой пластинкой, недоразвитыми палисадными клетками, большими воздухоносными полостями, слабо развитым кутикулярным покровом. В то же время лист земляники, сформированный в условиях *ex vitro*, был дифференцирован на столбчатую и губчатую ткань, имел хорошо развитый кутикулярный покров.

Аналогичные результаты были получены D. J. Donnely и W. E. Vidaver [19] при исследовании листьев малины, регенерированных *in vitro*.

S. Waldenmaier и G. Schmidt [20] наблюдали гистологические различия листьев рододендрона *in vitro* и *ex vitro* при их закаливании. Различия эти состояли в отсутствии дыхательных пор, слабо структурированном мезофилле у листьев *in vitro*, а у листьев *ex vitro* происходило изменение анатомического строения листьев: увеличивалась их толщина, число слоев эпидермиса и палисадной ткани, появилась кутикула. Аклиматизация при низкой влажности вела к четкой дифференциации на столбчатую и губчатую паренхиму.

Исследования, проведенные нами по изучению внутреннего строения листа в зависимости от условий культивирования, показали, что регенеранты интродуцированных сортов голубики высокой (*Dixi*, *Bluecrop*) и брусники обыкновенной (*Koralle*), выращенные в условиях *in vitro*, не имели четкой дифференциации мезофилла на столбчатую и губчатую ткань, имели тонкую листовую пластинку, слабо развитый кутикулярный покров, недоразвитый устьичный аппарат, что способствовало постоянному открытию устьиц и чрезмерной транспирации.

Листья, развивающиеся в условиях оранжереи, имели четкую дифференциацию мезофилла на столбчатую и губчатую паренхиму, кутикулярный покров, развитый устьичный аппарат, что способствовало нормальному обеспечению транспирации.

Листья растений, высаженных в открытый грунт, по общему плану строения не отличались от листьев оранжерейных растений. Они имели четко дифференцированную структуру листа на столбчатую и губчатую паренхиму, хорошо развитый кутикулярный покров, устьичный аппарат. Однако следует отметить, что наблюдалась разница в изменении количественных показателей структуры листа. Так, листья из открытого грунта имели более толстую листовую пластинку, больше слоев столбчатой ткани, большую длину клеток, меньший объем межклетников по сравнению с листьями из оранжереи и условий *in vitro* [21].

Исследованные нами сорта растений реагировали на условия культивирования изменением как количественных показателей, так и внутреннего строения листа. Условия открытого грунта с повышенной солнечной инсоляцией и относительно низкой влажностью воздуха способствовали увеличению толщины пластинки листа, коэффициента палисадности, длины клеток столбчатой паренхимы, числа устьиц на 1 мм² поверхности листа, а условия оранжереи с пониженной солнечной инсоляцией и относительно высокой влажностью воздуха приводили к уменьшению величины данных показателей.

Условия культивирования *in vitro*, характеризующиеся относительно высокой влажностью воздуха в культуральных сосудах, пониженной освещенностью и гетеротрофным типом питания, способствовали уменьшению толщины листовой пластинки, сокращению числа устьиц на 1 мм² поверхности листа, отсутствию дифференциации на столбчатую и губчатую паренхиму. Структура листа *in vitro* имеет все признаки листа растения, произрастающего в тени (гомогенный мезофилл, состоящий из клеток только губчатой паренхимы, имеющих изодиаметрическую форму; утонченная листовая пластинка; небольшое число устьиц на 1 мм² поверхности листа; отсутствие кутикулы).

Следует отметить, что различия в структуре листа сопряжены с их функциональными различиями. Примером тому может служить обстоятельное исследование, касающееся сравнительной анатомии и физиологии березы азиатской, выращенной в асептической культуре и в теплице, проведенное М. А. Smith et al. [22]. Авторы приходят к выводу о слабом развитии васкулярной системы в условиях *in vitro* и, как следствие, о повышенной чувствительности таких растений к водному стрессу, характерному для условий *ex vitro*. Ими была обнаружена низкая интенсивность фотосинтеза при очень низком уровне освещенности, что сопряжено с отсутствием четкой дифференциации листа на столбчатую и губчатую ткань в культуре *in vitro*.

После переноса растений в условия *ex vitro* (в теплицу) исследователи наблюдали увеличение интенсивности фотосинтеза и изменения в анатомии листа. По их мнению, растения, выращенные в асептических условиях, в значитель-

ной мере изменяют свои анатомические и физиологические свойства по сравнению со своими двойниками, культивируемыми в условиях *ex vitro*. Различия эти в основном являются результатом воздействия специфической среды в асептической культуре и исчезают после переноса растений в условия *ex vitro* благодаря быстрому восстановлению метаболизма.

Интересные исследования были проведены J. Solarova [23] по изучению суточной изменчивости концентрации CO_2 в культуральных сосудах, в которых выращивались растения-регенеранты, полученные из кусочков листьев. Оказалось, что в темновой период концентрация CO_2 в сосудах увеличивалась и была связана с размером регенерантов и содержанием сахарозы в среде. В течение светового периода концентрация CO_2 в пробирках уменьшилась, и несмотря на низкую освещенность ($100 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$) через 3–4 ч освещение достигало точки компенсации.

Автором сделан вывод, что низкая концентрация CO_2 в закрытых сосудах для культивирования растений-регенерантов – основной лимитирующий фактор, сдерживающий их рост.

Таким образом, одной из причин низкой интенсивности фотосинтеза, наблюдаемой у растений-регенерантов в культуре *in vitro*, является пониженная концентрация CO_2 в этих условиях. При переносе растений в условия оранжереи и открытого грунта концентрация CO_2 повышается, что способствует увеличению интенсивности фотосинтеза и, как следствие, ускорению их роста.

На основании сравнительного анализа структурно-функциональных особенностей регенерантов в условиях *in vitro* и *ex vitro*, базирующегося на литературных данных и материалах собственных исследований, мы пришли к выводу, что, во-первых, условия культивирования *in vitro* и *ex vitro* накладывают отпечаток на структуру и функцию регенерантов; во-вторых, структурно-функциональная организация регенерантов – мобильная система и может перестраиваться в соответствии с изменившимися условиями окружающей среды. Это значит, что различия в строении и функции листьев растений, выращенных в асептической культуре, в условиях оранжереи и в открытом грунте, свидетельствуют о пластичности листа – органа, способного перестраивать свою структуру и функцию адекватно условиям культивирования, что теоретически является гарантом успешной адаптации растений при переносе их из условий *in vitro* в условия *ex vitro*.

На практике, как показали наши наблюдения за процессом адаптации интродуцированных сортов голубики высокой (*Dixi*, *Bluecrop*, *Herbert*, *Rancocas*, *Covill*, *Earlyblue*), брусники обыкновенной (*Koralle*, *Masovia*, *Erntedank*), рододендронов, сирени при переносе их из условий *in vitro* в условия *ex vitro*, нам удалось избежать потерь материала в критический для него момент благодаря соблюдению технических приемов, базирующихся на выводах, подтвержденных результатами экспериментальных исследований.

В целях предотвращения гибели материала от чрезмерной транспирации (это касается не только голубики, брусники, рододендронов, сирени), которая

происходит из-за резкого снижения влажности в условиях *ex vitro*, а также из-за несовершенной структурно-функциональной организации листа с точки зрения условий *ex vitro*, в первую очередь необходимо поднять тургор регенерантов до максимальной величины. Обеспечивается это погружением материала в сосуд с дистиллированной водой на 5–6 ч.

Второе неперенное условие – создание высокой влажности в оранжерее (не ниже 90%) и устранение сильных потоков воздуха, то есть исключение какого бы ни было ветра, так как ветер способствует иссушению листьев из-за быстрой отдачи влаги. Отсутствие ветра и высокая влажность будут способствовать созданию градиента давления пара между листьями и воздухом.

В первые 2–3 недели культивирования регенерантов (до образования корней) в оранжерее необходимо создать условия, идентичные условиям *in vitro*. Это значит, строго контролировать влажность, поддерживать температуру, аналогичную той, при которой культивировались растения в условиях *in vitro*, и относительно низкую интенсивность освещения (500 лк).

Таким образом, высокая влажность воздуха не будет способствовать интенсивной транспирации, что сохранит растение от увядания. Высокая температура и низкая интенсивность освещения (500 лк) являются благоприятными условиями для низкой интенсивности фотосинтеза и приостановки роста регенеранта. Запас имеющихся в регенеранте метаболитов пойдет на образование корней.

После образования корней необходимо постепенно снижать влажность воздуха вокруг регенерантов и увеличивать интенсивность освещения. Это позволит завершить структурную перестройку листа: появится кутикулярный слой, изменят свою форму клетки эпидермиса, произойдут изменения в строении мезофилла листа. Лист приобретет черты ксероморфной структуры, и растению уже будет не страшна низкая влажность воздуха и даже сильный ветер, характерный для условий открытого грунта.

Перечисленные процедуры, строго выполняемые нами при переносе растений интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, сирени, рододендронов из условий *in vitro* в условия *ex vitro*, позволили сохранить жизнеспособность растениям и обеспечить 100%-ное их выживание и адаптацию [1, 6].

Подводя итог изложенному, можно заключить, что успех адаптации растений-регенерантов при переходе из условий *in vitro* в условия *ex vitro* зависит от наших теоретических знаний, базирующихся, с одной стороны, на результатах экспериментальных исследований, а с другой – на строгом соблюдении простых технических условий.

Подтверждением этого может служить пример 100%-ной адаптации растений-регенерантов интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной не только в условиях оранжереи, но и в условиях открытого грунта.

Сравнительная характеристика сезонного развития растений голубики высокой, полученных в стерильной культуре, с растениями, размноженными че-

ренкованием, позволила заключить, что их развитие было сходным и зависело от погодных условий и метода размножения. Меристемные растения голубики обладали рядом преимуществ по сравнению со своими двойниками из черенков: повышенной морозоустойчивостью, усиленным образованием базальных побегов, цветочных почек, высоким урожаем. Так, в первый год наблюдений урожай составил 200 г ягод на одно растение, на второй год – 400, на третий – более 700 г, а для растений, выращенных путем черенкования, – соответственно 100, 150, 250 г ягод на одно растение. Однако несмотря на положительную характеристику клонально размноженных растений в литературе иногда можно встретить данные об аномальном их развитии (полегание, недоразвитая корневая система, гибель растений). С нашей точки зрения, причина таких отклонений кроется отнюдь не в самом методе клонального микроразмножения (ибо некоторые авторы склонны приписывать их именно методу и считать, что он не может быть использован для размножения того или иного вида либо сорта растения). По нашему глубокому убеждению, сложившемуся в результате анализа экспериментального материала по морфогенезу, регенерации, а также структурно-функциональной адаптации регенерантов интродуцированных сортов исследованных нами растений, одной из основных ошибок, приводящих к негативным последствиям, является рассмотрение клонального микроразмножения как «инструмента», с помощью которого можно получить материал в неограниченном количестве. Целостная картина клонального микроразмножения может быть получена только в результате рассмотрения его как единого сложного многофакторного процесса, состоящего из двух принципиально разных этапов – *in vitro* и *ex vitro*, базирующегося на единой теоретической основе, с одной стороны – на морфогенезе и регенерации в условиях *in vitro*, с другой – на структурно-функциональной адаптации регенерантов в условиях *ex vitro*, что позволит создать теоретические предпосылки и разработать совершенную технологию для любого вида растения.

В результате комплексного исследования, проведенного по индуцируемому морфогенезу и регенерации, а также структурно-функциональной адаптации регенерантов при переносе их из культуральных сосудов в условия оранжереи и открытого грунта, разработаны технологии клонального микроразмножения для 14 интродуцированных сортов голубики высокой, 5 сортов брусники обыкновенной, 13 видов рододендронов, 5 сортов сирени обыкновенной. Разработанные технологии обладают рядом преимуществ: 1) сокращение технологического цикла в культуре *in vitro* с трех стадий до двух (за счет исключения стадии укоренения на питательной среде); 2) экономия дорогостоящих компонентов питательной среды (гормональных добавок и др.), необходимых для ризогенеза; 3) устранение потерь, связанных с повреждением корневой системы при отмывании ее от агара; 4) сокращение сроков получения товарной продукции с восьми лет до двух-трех.

Разработанные технологии позволяют поставить на промышленную основу производство здорового, экологически чистого посадочного материала таких

ценных растений, как интродуцированные сорта голубики высокой, брусники обыкновенной, сирени, интродуцированные виды рододендронов, обладающие пищевой и лекарственной ценностью, а также радиопротекторным действием (брусника, голубика), и удовлетворить потребности народного хозяйства Беларуси и других регионов СНГ, пострадавших от аварии на Чернобыльской АЭС, в этой продукции. Рододендронам, кроме декоративных качеств, присущи лекарственные, дубильные, эфирно-масличные, почвозащитные и водорегулирующие свойства. Эти растения с древних времен широко применялись в народной медицине и используются при лечении различных заболеваний в наши дни. Газоустойчивость рододендронов позволяет озеленять ими крупные города и промышленные центры.

Разработаны три метода регенерации интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, сирени, интродуцированных видов рододендронов: 1) через активацию пазушных меристем; 2) через пролиферацию каллуса и дальнейшую регенерацию из него растений, 3) непосредственно из ткани листа, минуя стадию образования каллуса. Регенерация непосредственно из ткани листа может быть использована в системе генетической трансформации с целью получения трансгенных растений с новыми свойствами; регенерация через пролиферацию каллуса – в селекционной работе; регенерация через активацию пазушных меристем – для клонального микроразмножения, сохранения редких и исчезающих видов, поддержания биоразнообразия растений, его генофонда.

Благодаря результатам экспериментальных исследований индуцируемого морфогенеза и регенерации растений создан банк генотипов, представленный коллекцией стерильных культур, включающей свыше 30 видов и сортов представителей сем. *Vacciniaceae* S. F. Gray и *Ericaceae* Juss. (рис. 13.1–13.4 см. цв. вклейку), служащий одним из путей сохранения биоразнообразия растений.

Основным препятствием в хранении стерильной культуры брусники, голубики, рододендронов и других растений является их быстрое старение, требующее частых пересадок материала на свежую питательную среду (каждые 4–6 недель).

Этот материал представляет огромный интерес как с практической, так и с научной точки зрения. Его можно использовать в качестве модельных объектов для изучения морфогенетических и регенерационных процессов, протекающих у эксплантов на стандартных и модифицированных питательных средах; факторов, влияющих на эти процессы, а также для изучения генетической и эпигенетической стабильности/вариабельности регенерантов, получения трансгенных растений с новыми ценными свойствами.

Для поддержания коллекции стерильных культур ее необходимо часто пересаживать (каждые 2–3 недели) на свежие питательные среды. Однако такие пересадки крайне нежелательны, поскольку сопряжены с существенными недостатками: во-первых, возможностью появления соматоклональной изменчивости (из-за генетической нестабильности часто пересаживаемого материала);

во-вторых, опасностью загрязнения чужеродным генетическим материалом и случайной утерей собственного генетического материала; в-третьих, трудоемкостью процессов, связанных с необходимостью регулярных пересадок на свежие питательные среды; в-четвертых, высокой стоимостью компонентов питательной среды.

В связи с вышеизложенным назрела острая необходимость в разработке технологии депонирования коллекции стерильных культур. Решение этой проблемы потребовало проведения фундаментальных научных исследований, благодаря которым была изменена кинетика роста стерильных культур в сторону замедления, что позволило увеличить интервал между пересадками с 2–3 недель до 1 года и более.

На основании результатов экспериментальных исследований осуществлен подбор компонентов питательной среды (осмотические ингибиторы и ретарданты, регуляторы роста, нетрадиционные добавки), способных изменить кинетику роста стерильной культуры в сторону ее замедления [24, 25]. Решение этой задачи позволило разработать технологию депонирования коллекции стерильных культур, представленной более чем тридцатью видами и сортами, принадлежащими к семейству *Vacciniaceae* и *Ericaceae*, сохранить банк ее генотипов, способствующий решению задач, возникающих в генетике, селекции, растениеводстве, охране окружающей среды (сохранение редких и исчезающих видов растений). Хранение культуры в состоянии замедленного роста дало возможность уменьшить финансовые затраты на этот процесс благодаря увеличению интервала между пересадками до 6–12 мес. и более вместо 2–3 недель. Это позволило освободить время для занятия клональным микроразмножением декоративных, пряно-ароматических, лекарственных, редких и исчезающих видов растений, то есть изучением процессов морфогенеза, регенерации, структурно-функциональной адаптации регенерантов при переносе их из культуральных сосудов в условия оранжереи и открытого грунта.

Научные исследования, проведенные по изучению морфогенеза и регенерации интродуцента адониса (горичвета), весеннего – *Adonis vernalis* L., а также факторов, влияющих на эти процессы, позволили разработать: 1) лабораторный регламент получения стерильной культуры адониса весеннего; 2) лабораторный регламент получения регенерантов адониса весеннего; 3) лабораторный регламент получения каллусной культуры адониса весеннего; 4) технологию клонального микроразмножения адониса весеннего.

Разработанные регламенты могут быть использованы для получения альтернативных источников сырья для фармацевтической промышленности.

Результаты экспериментальных исследований, полученные по индуцируемому морфогенезу и регенерации растений позволили разработать методы регенерации селекционных гибридов в условиях стерильной культуры, создать гибридный фонд, ускорить селекционную работу по выведению новых сортов представителей семейства *Vacciniaceae*.

К настоящему времени в мире разработаны технологии клонального микроразмножения на лабораторном уровне более чем для 2400 видов растений. Однако коммерческих лабораторий, которые могли бы поставить эти технологии на поток, в мире немного (около 130, не считая тех, которые занимаются размножением орхидных).

С нашей точки зрения, созданию коммерческих фирм-лабораторий должно предшествовать прогнозирование рентабельности и социальной необходимости производства данного вида продукции (в данном случае посадочного материала). Стоимость продукции, рыночная цена, емкость рынка, сезонность поставки для плодовых и ягодных растений, выбор видов и сортов растений – все эти факторы должны быть учтены перед принятием решения об организации коммерческой лаборатории.

Следует отметить, что сдерживание темпов внедрения технологий клонального микроразмножения ягодных и декоративных растений в практику в условиях ЦБС НАН Беларуси вызвано недостающим объемом специального оборудования, обученного персонала и финансирования.