

II Международная конференция

ЯГОДЫ РОССИИ 2019

Преимущества и недостатки технологии
размножения *in vitro*.

Внедрение современных методов контроля
качества посадочного материала
(на примере голубики высокой)



Старший научный сотрудник отдела биохимии и биотехнологии
растений Государственного научного учреждения Центральный
ботанический сад Национальной Академии наук Беларуси

Филипеня Вероника Леонидовна

Мировая индустрия получения посадочного материала с использованием биотехнологических приемов

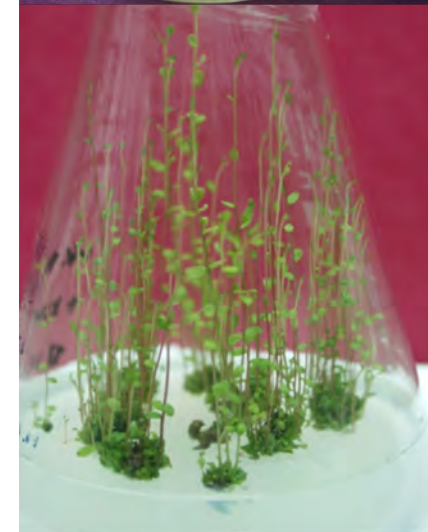


Метод размножения в культуре *in vitro* основан на выращивании изолированных клеток, тканей, частей и органов растений в стерильных условиях на искусственной питательной среде.

Коммерческое использование

Начиная с 80-х годов прошлого столетия в относительно короткие сроки во всем мире были созданы многочисленные коммерческие лаборатории, использующие потенциал клонального размножения *in vitro* для производства качественного посадочного материала ценных сельскохозяйственных и декоративных культур.

В настоящее время размножение *in vitro* стало незаменимым элементом мировой индустрии посадочного материала, но этот метод размножения ни в коем случае не является простым и, несомненно, может стать основным источником рисков получения саженцев с измененными исходными характеристиками, причем в очень больших объемах.



Некоторые из мировых производителей клонированного *in vitro* посадочного материала голубики высокой

Преимущества и недостатки микрклонального размножения растений

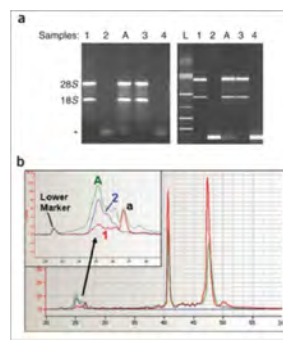
Преимущества, подтвержденные многолетними результатами практического использования:

- высокий коэффициент размножения;
- получение однородного (стандартизированного), оздоровленного и омоложенного посадочного материала;
- проведение работ по производству саженцев в течение всего года (в том числе и растений, имеющих в годовом цикле период покоя), экономия площадей под маточники;
- массовое размножение растений, трудно размножаемых традиционными методами и др.

Недостатки:

- высокая наукоемкость, необходимость тщательной научно обоснованной разработки технологических этапов размножения и их строгого выполнения специально подготовленным персоналом;
- при не соблюдении регламента разработанной технологии и низком контроле качества производимых саженцев возникает высокая вероятность получения растений, имеющих отклонения от исходных характеристик, в том числе обусловленных генетическими мутациями.





Этапы технологии производства саженцев голубики с использованием культуры *in vitro*

Схема технологического процесса

Базовые
(исходные)
растения

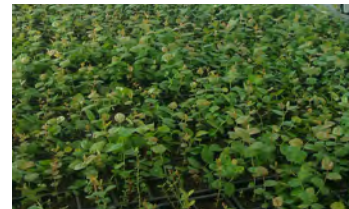
- Молекулярно-генетический анализ для подтверждения сортоответствия
- Фитосанитарная оценка с использованием серологического и молекулярно-генетического анализов на наличие основных патогенов культуры
- Сертификация исходного растительного материала

Культура
in vitro

- Получение и стабилизация *in vitro* культуры
- Собственно клонирование (размножение) *in vitro*
- Укоренение в асептических условиях

Адаптация
ex vitro,
получение
стандарт
ных
саженцев

- Адаптация *ex vitro*
- Подращивание в кассетах и горшках
- Сертификация посадочного материала



Этапы технологии и связанные с ними основные риски производства саженцев, не соответствующих стандартам



Базовый (исходный) растительный материал

- Использование исходного материала сомнительного качества (без сортовых свидетельств, полученного у непроверенных поставщиков и т.д.) или *in vitro* культур растений без соответствующих документов;
- использование зараженного системными патогенами материала (без фитосанитарного сертификата, не тестированного на вирусы и другие системные патогены).



In vitro размножение

- Неправильно подобранные условия размножения (состав и количество фитогормонов в питательной среде, температура, влажность, свет и др.);
- условия работы, допускающие заражение культур, неподготовленный персонал;
- отсутствие должного учета и контроля, условия, позволяющие перепутать сорта;
- отсутствие выбраковки растений с отклонениями в росте и развитии.



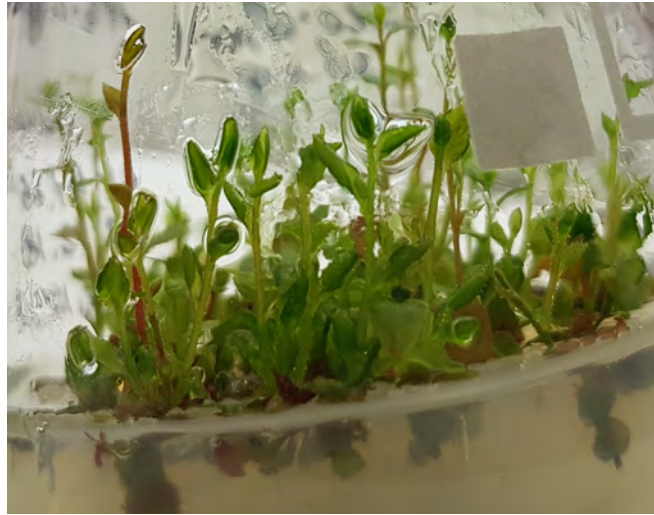
Адаптация *ex vitro*, подращивание, получение стандартных саженцев

- Нарушение агротехники выращивания, условия, допускающие заражение;
- отсутствие должного учета и контроля, условия позволяющие перепутать сорта;
- отсутствие выбраковки растений с отклонением в росте и развитии;
- отсутствие сортовой и фитосанитарной сертификации перед продажей .

Примеры возможных отклонений в росте и развитии растений



Массовое образование побегов из клеток каллуса, возможно возникновение генетических мутаций.
Причина – слишком большое количество или не оптимальное соотношение фитогормонов в питательной среде



Массовое образование аномальных побегов.
Причина – высокая влажность и температура в период культивирования на фоне повышенного содержания фитогормонов в питательной среде



Корневая система саженца поражена грибной инфекцией.
Причина – переувлажненный в течение длительного времени субстрат

Технология размножения голубики высокой с применением биотехнологических приемов, разработанная и прошедшая апробацию в отделе биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»



Внедрение современных методов контроля качества посадочного материала (на примере голубики высокой)

От качества посадочного материала зависят урожайность и долговечность промышленных посадок, коммерческие характеристики плодов.

Важной характеристикой саженцев является их соответствие заявляемому сорту.

В настоящее время идентификацию сортов по морфологическим признакам дополняют идентификацией при помощи анализа ДНК (ДНК-маркирования) с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Выбор метода ДНК-маркирования зависит от решаемых задач.

Для определения соответствия сорта стандарту наиболее информативным и в высокой степени воспроизводимым методом является **SSR-маркирование**. Этот метод обеспечивает возможность проверки соответствия сортов голубики критериям отличимости, однородности и стабильности (ООС-теста) и рекомендуется как приоритетный для использования при проведении экспертизы сортов Международным союзом по охране новых сортов растений (UPOV). Он может быть применен при решении таких задач как защита авторских прав, определение соответствия сорта стандарту при закупке посадочного материала, для создания компьютерной базы данных ДНК-паспортов охраняемых сортов растений, хозяйственно–ценных культур и др.

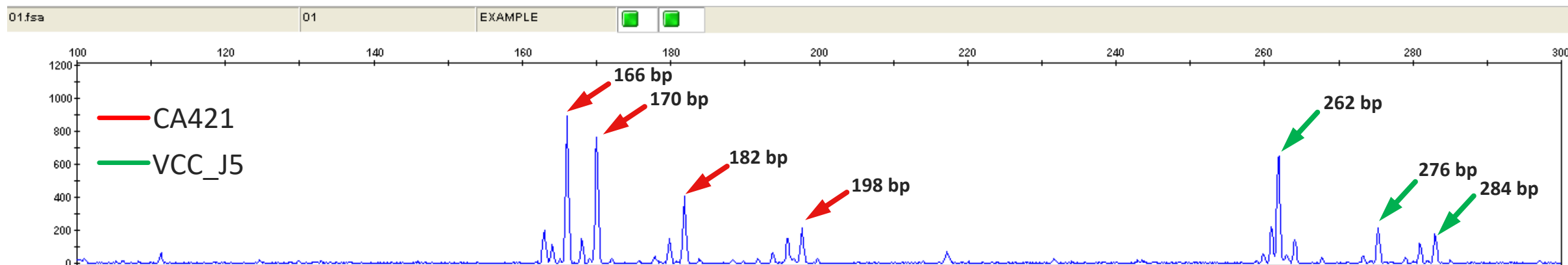
SSR-маркирование является основным методом для проверки базовых (исходных растений) перед получением *in vitro* культуры.

Внедрение современных методов контроля качества посадочного материала (на примере голубики высокой)

Сотрудниками отдела биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад» для сортов голубики на основе минимальной микросателлитной панели [Hinrichsen, 2009] подобран достаточный для идентификации таксонов (сортов) набор из пяти пар SSR-праймеров, позволяющих при постановке ПЦР охватить различные области генома.

Для учета результатов анализа описывается спектр (фенотип) ПЦР продуктов. Обозначение маркеров (аллелей) производится по названию праймера, отобранного для полимеразной цепной реакции, и размера зоны (в парах нуклеотидов).

Аллельный состав двух SSR-локусов тестируемого образца голубики высокой



Внедрение современных методов контроля качества посадочного материала (на примере голубики высокой)

Молекулярно-генетический паспорт образцов голубики в виде таблицы представлен ниже. Для каждой пары праймеров указывается аллельный набор, полученный в результате анализа (верхняя строка), а также аллельный спектр из **Corvallis Vaccinium Database** (Министерство сельского хозяйства США: www.ars-grin.gov; <https://www.ars-grin.gov/cor/catalogs/vaccult.html>; <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/accessiondetail.aspx?1449857>) и литературный источник.

Генетический паспорт образца *Vaccinium corymbosum* L. , для которого подтверждена сортовая принадлежность

BLUETTA

Праймер (Локус)	Маркеры (Аллели)			
CA421F	166	180	184	222
	166	180	184	222 [Boches, 2006]
VCCJ5	257	259	262	
	257	259	262	[Boches, 2006]
NA1040	184	186	192	
	184	186	192	[Boches, 2006]
NA0741	246	266	268	
	246	266	268	[Boches, 2006]
VCCK4	172	182	188	
	172	182	188	[Boches, 2006]

Генетический паспорт образца *Vaccinium corymbosum* L. с неподтвержденной сортовой принадлежностью

CHANDLER

Праймер (Локус)	Маркеры (Аллели)			
CA421F	180	182	186	190
	170	182	192	198 [Boches, 2006]
VCCJ5	259	282		
	259	261	282	[Boches, 2006]
NA1040	188	192	200	208
	192	210		[Boches, 2006]
NA0741	268	291		
	249	270	289	[Boches, 2006]
VCCK4	182	190	241	
	182	203	241	[Boches, 2006]

Внедрение современных методов контроля качества посадочного материала (на примере голубики высокой)

Corvallis Vaccinium Database (Министерство сельского хозяйства США: www.ars-grin.gov; <https://www.ars-grin.gov/cor/catalogs/vaccult.html>; <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/accessiondetail.aspx?1449857>)

NCGR-Corvallis *Vaccinium* Catalog

All Blueberry, Cranberry and Lingonberry Cultivars and

Follow links to the Germplasm Resources Information Network (GRIN) for additional information.
Catalog last updated: 01 April 2009

[NCGR-Corvallis Distribution Policies](#)

Traits listed are intended for preliminary subgrouping of accessions. Traits are from germplasm release notices, published by NCGR-Corvallis.

- [AJ = PI 554979](#) (492.001) - *Vaccinium macrocarpon* Aiton CRANBERRY - VIRUS TESTED
- PROSTRATE DWARF HABIT
- [Aliceblue = PI 554959](#) (848.001) - *Vaccinium virgatum* Aiton RABBITEYE - VIRUS TESTED
- EARLY LOW CHILL 300 HOURS
- [Amerland = PI 618095](#) (1107.002) - *Vaccinium vitis-idaea* L. LINGONBERRY - VIRUS TESTED
- PROSTRATE DWARF HABIT
- [Angola = PI 554850](#) (284.001) - *Vaccinium corymbosum* L. SOUTHERN Highbush - VIRUS TESTED
- EARLY LOW CHILL
- [Aron = PI 554865](#) (516.001) - *Vaccinium corymbosum* L. NORTHERN Highbush - VIRUS TESTED

Donors:

1. Volk, Elizabeth, Oregon State University

Comment: Received virus-tested from E. Volk to NCGR-Corvallis

Pedigree

GM-37 (Jersey x Pioneer) x CU-5 (Stanley x June)

Observations

Click link below to see detailed observation data:
[Detailed Accession Observation Page](#)

Characterization and Evaluation Data:

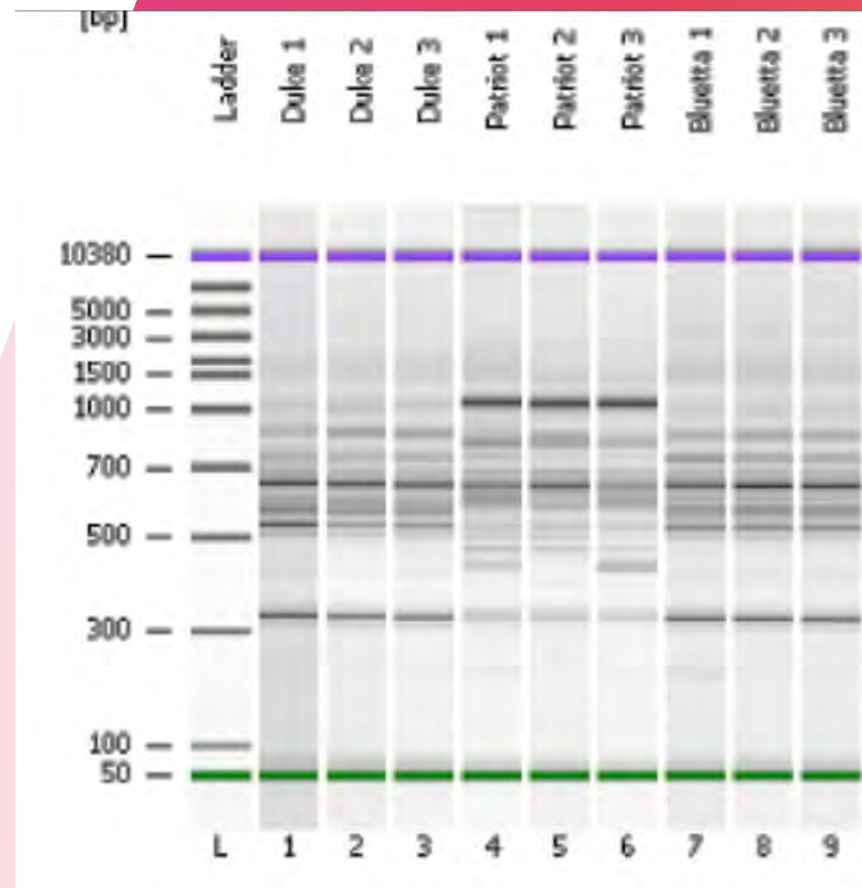
Category	CYTOLOGIC						GENSTOCK VACCINIUM CORE SUBSET
	DNA Ratio		Ploidy		Ploidy Equation		
Descriptor	Value	Value	Value	Value	Value	Value	
Value	1.47	1.48	4x	4x	2n = 4x = 48,	2n = 4x = 48	
Study/Environment	2012.6.30.CYTOLOGY	2012.CYTOLOGY	2012.6.30.CYTOLOGY	2012.CYTOLOGY	2012.6.30.CYTOLOGY	2012.CYTOLOGY	VACCINIUM.CORE.1998

Molecular Data:

Poly Type	MICROSATELLITE	MICROSATELLITE	MICROSATELLITE	MICROSATELLITE
Marker	CA112F	CA169F	CA190R	CA2
Value	142	109 115	240	230
Evaluation	VACCINIUM.CULTIVATED.BLUEBERRY.SSR.2005	VACCINIUM.CULTIVATED.BLUEBERRY.SSR.2005	VACCINIUM.CULTIVATED.BLUEBERRY.SSR.2005	VACCINIUM.CULTIVATED.BLUEBERRY.SSR.2005
Study Type	G DIVERSITY	G DIVERSITY	G DIVERSITY	G DIVERSITY
Inventory ID	CVAC 851 .001 PL	CVAC 851 .001 PL	CVAC 851 .001 PL	CVAC 851 .001 PL

Внедрение современных методов контроля качества посадочного материала (на примере голубики высокой)

Для подтверждения отсутствия возникновения мутаций в процессе клонирования *in vitro* предпочтительно использовать подходящие для решения данной задачи, но более экономичные молекулярно-генетические методы анализа, такие как **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA), **ISSR** (Inter simple sequence repeat), **SCAR** (Sequence-characterised amplified region) и некоторые другие. Для применения вышеперечисленных методов ДНК-маркирования необходимо наличие сорта-эталона, с которым проводится сравнение. Без сорта-эталона при помощи этих методов сортовую чистоту посадочного материала подтвердить нельзя.



01 От качества посадочного материала зависят урожайность и долговечность промышленных посадок, коммерческие характеристики плодов.

02 Мониторинг качества должен осуществляться на всех этапах технологического процесса. Для этого необходимо использовать самые современные научные методы.

03 Каждый производитель посадочного материала должен осознавать важность и свою ответственность в отношении качества и соответствия стандартам сортовой чистоты поставляемых на рынок саженцев.



II Международная конференция

ЯГОДЫ РОССИИ 2019

Спасибо за внимание!



Контакты:

Зам. директора по научной и инновационной работе ГНУ «
Центральный ботанический сад НАН Беларуси», к.б.н.

Гончарова Людмила Владимировна

Тел. +375(17)284-16-25; +375(29)160-22-93

Старший научный сотрудник отдела биохимии и биотехнологии
растений ГНУ « Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,

Филипеня Вероника Леонидовна

+375(29)693-25-83; email: ver.filipenia@gmail.com