



Руководство по размножению: генетических ресурсов

Введение

М.Э. Дуллу¹, Дж. Хансон², А. Йорге^{1,2} и И. Торманн¹

¹Bioversity International, Рим, Италия

²Международный НИИ животноводства, Аддис-Абеба, Эфиопия

Вводная информация

Главная задача генбанков – обеспечить жизнеспособность и высокое качество образцов гермоплазмы в течение максимально долгого времени. Со временем, даже при соблюдении высоких стандартов управления, гермоплазма портится и появляется необходимость в ее размножении. Для многих генбанков трудно поддерживать коллекции на приемлемом уровне жизнеспособности, из-за больших затрат, ограниченного наличия технического потенциала и специальных знаний, особенно в тех случаях, когда возникают сложности с процедурами размножения, которые требуются для некоторых видов растений (FAO 1998). Это стало результатом отставания регенерационных работ, что является угрозой для важных уникальных материалов, и этому отводится главное место в докладе FAO, а также в стратегиях по сохранению сельскохозяйственных культур, разработанных за прошедшие несколько лет при поддержке Глобального Фонда Разнообразия Сельскохозяйственных Культур (далее по тексту Доверительным Фондом) во многих случаях под руководством центров КГМСХИ (CGIAR). Доверительный Фонд, поэтому, поддерживает размножение таких приоритетных находящихся под угрозой исчезновения материалов растений по всему миру.

Хотя существует видовой метод способствующий принятию решений по размножению (Sackville Hamilton and Chorlton 1997), требуются определенные знания и опыт. К сожалению, несмотря на наличие таких знаний в генбанках по всему миру, включая центры КГМСХИ, до сих пор не сделаны никакие попытки по идентификации, сопоставлению и публикации о наилучших практических способах проведения размножения так, чтобы сохранить генетическую целостность и добиться оптимальной жизнеспособности получаемого растительного материала. Поэтому Доверительный Фонд обратился к Bioversity International, действующей в рамках Общесистемной программы по генетическим ресурсам растений (SGRP), с просьбой разработать руководства по размножению генетических ресурсов 21 основной сельскохозяйственной культуры (ячмень, фасоль, хлебное дерево, каसाва, нут, вигна (*Vigna spp*), вика (конские бобы), пальчиковое просо, чина (*Lathyrus*), кукуруза, основные ароиды (например, таро, колоказия, кокосовый ямс), чечевица, перловое просо, каянус (голубиный горох), картофель, рис, сорго, батат, пшеница и ямс), которые охватывают инициативу Доверительного Фонда в сфере размножения генетических ресурсов растений.

Определение

В данных руководствах термин размножение трактуется как восстановление коллекционных образцов генетически подобными оригинальным образцам данной культуры, в случае снижения жизнеспособности или недостаточного количества растений. Размножение также может потребоваться новым образцам, которые предполагается заложить на долгосрочное хранение, а также в качестве санитарного мероприятия при борьбе с болезнями. В случае хранения образцов клоновых сельскохозяйственных культур на участках генбанка, работа по размножению проводится либо на этом же участке, либо переносится на другой в целях безопасности или избегания болезней и вредителей.

Основные руководящие принципы

Обеспечение генетической целостности

Размножение гермоплазмы – наиболее важная из процедур в процессе управления генбанком по причине особого риска, которому подвергается генетическая целостность гермоплазмы из-за отбора, скрещивания или механического смешивания. Риск утраты генетической целостности, в основном, высок в случае размножения гетерогенных образцов гермоплазмы скрещиваемых видов сельскохозяйственных культур. Цель размножения – поддержание оригинального генетического разнообразия и структуры

коллекционного образца или коллекции (см. раздел «Руководство по общей регенерации» ниже).

Обеспечение эффективности

Для производства достаточного количества семян или посадочного материала следует учитывать коэффициент репродукции вида образца культуры на участке размножения. Количество семян, черенков и посадочного материала других типов, необходимых для размножения следует тщательно рассчитать, учитывая количество растений, которое желательно в итоге получить, уровень всхожести и укоренение в поле данного образца, количество семян, которое необходимо получить после размножения, а также проводятся ли описание и оценка совместно с размножением, или нет.

Обеспечение качества

Цель размножения гермоплазмы сельскохозяйственных культур – получение достаточного количества здоровых, жизнеспособных семян, клубней и других пропагул. Прежде, чем предоставлять гермоплазму кому-либо, генбанки обязаны провести ее анализ на предмет обнаружения переносимых семенами или вегетативными органами патогенов или вредителей, чтобы не допустить распространения этих объектов и болезней. Эта гермоплазма представляет собой основной источник неинфицированного материала для селекционных программ, разведения и использования в других проектах.

Руководство по общей регенерации

Тип коллекции

Два типа коллекций в генбанках, признанные в качестве семян сельскохозяйственных культур, являются активными и базовыми коллекциями. Материал из активной коллекции предпочтительно регенерировать, используя оригинальные семена из базовой коллекции. Однако также приемлемо использовать семена из активной коллекции не более трех циклов размножения перед тем, как возвращаться к оригинальным семенам (базовым коллекциям) (FAO/IPGRI 1994). Для размножения образца базовой коллекции следует использовать только остаток семян самого оригинального образца, находящегося в базовой коллекции.

В случае с клонально размножающимися сельскохозяйственными культурами, материал обычно поддерживается в полевых коллекциях (Engels and Visser 2003). Некоторые виды тропических деревьев можно пересаживать каждые 15 лет или дольше, а другие требуют замены раз в несколько месяцев. Практическую пользу в этом случае приносит организация дублетных коллекций, поскольку в отличие от тех культур, которые размножаются семенами, у этих не будет остатка семян, которые можно было бы

использовать как крайнее средство, если некоторые растения погибнут. Клонально размножающиеся сельскохозяйственные культуры также можно сохранять *in vitro* или способом криоконсервации в тех случаях, когда для конкретных культур есть разработанные методики, и эти материалы также могут играть вспомогательную роль дублетных образцов коллекций полевых генбанков.

В этом сборнике руководств не описывается размножение образцов, сохраняемых *in vitro* или в криоколлекциях.

Когда надо проводить размножение

Размножение – дорогостоящая процедура и ее следует осуществлять не чаще, чем это необходимо для поддержания коллекционного образца в достаточном количестве и адекватном качестве. Для большинства семян сельскохозяйственных культур размножение проводят в тех случаях, когда:

- жизнеспособность семян в активной коллекции падает ниже 85% от уровня исходной, что определяется мониторингом жизнеспособности (для получения дополнительной информации см. FAO/IPGRI 1994; Rao et al. 2006; ISTA 2008). Перед закладкой на хранение исходная жизнеспособность должна быть не менее 85%, хотя в некоторых генбанках допускается более низкий процент (<75%), особенно для диких видов.
- число жизнеспособных семян в образце популяции в активной или базовой коллекции меньше 1500 или меньше 250 семян по инбредной линии.

Размножение образцов низкого качества (с низкой жизнеспособностью) считается более важным, чем размножение имеющихся в недостаточных количествах семян. Образцы базовых коллекций имеют более высокий приоритет по сравнению с образцами активных коллекций.

Для клонально размножающихся сельскохозяйственных культур решение о проведении размножения зависит от:

- степени зрелости и деградации сохраняемого растительного материала;
- ситуации с вредителями и болезнями в полевой коллекции;
- необходимости замены коллекции из-за внешних неблагоприятных факторов (засухи, наводнения, циклона);
- необходимости увеличить количество материала для распространения.

Объем образца для посева

Объем посевного материала, полученного из коллекции семян для размножения следует выбирать произвольно, так, чтобы он был репрезентативным и представлял разнообразие коллекционного образца или коллекции, и с высокой степенью вероятности способствовал сохранению низкой частоте аллелей. Согласно приближенному подсчету (Crossa et al. 1993), количество семян от 90 до 210 необходимо сохранять с вероятностью 90-95% аллелей при частоте в пределах 0.003 – 0.05 для числа локусов от 10 до 150.

Для перекрестно опыляемых видов обычно требуется больше растений для поддержания генетической изменчивости в популяции, чем для самоопыляемых [для получения дополнительной информации см. Crossa (1995)]. Однако это не всегда так и может зависеть от степени изменчивости в субпопуляциях образца самоопыляемого вида.

Минимальное число семян для размножения может определяться нижеприведенным уравнением, исходя из стандартного объема образца, использованного для размножения, а также его жизнеспособности:

Количество необходимых для размножения семян = требуемая для размножения популяция растений / (процентный показатель всхожести¹ x процентный показатель ожидаемого укоренения в поле²) (см. Rao et al. 2006).

В случае с клонально размножающимися культурами, у которых растения одного образца должны быть генетически идентичными, выбор объема образца в большей степени зависит от вероятности выживания растений в поле и наличия гарантий того, что хоть несколько растений выживут и будут собраны, что обеспечит возможность размножения этого образца снова. Часто требуется как минимум 5 – 10 растений одного образца, или больше, если пропагулы требуются и для других целей.

Подготовка семян / посадочного материала

При подготовке хранимых в генбанке семян к размножению необходимо вынуть контейнеры из хранилища и, прежде чем открыть, дать им ночью прогреться при комнатной температуре, чтобы избежать резкого набора влаги семенами.

У клонально размножающихся культур для размножения может потребоваться широкий спектр частей растения – от клубневидных корней до частей лозы, стеблей, отростков и т. д. Для каждой из этих частей применяют конкретные методы отбора, обрезки, дезинфекции и краткосрочного хранения или выдержки перед посадкой.

Поддержание эффективной численности популяции

Одна из основных задач размножения – поддержание эффективной численности популяции (N_e) образца. Методы вычисления дисперсии N_e для: (1) сбора и регенерации гермоплазмы диплоидных однодомных видов, (2) перекрестно опыляемых видов и (3) смеси (смешанных) самоопыляемых и случайно скрещивающихся видов были разработаны и изложены, соответственно, в следующих публикациях: Crossa and Vencovsky (1994); Crossa and Vencovsky (1997) and Vencovsky and Crossa (1999).

В соответствии с Crossa and Vencovsky (1994) и Vencovsky and Crossa (1999), наилучшая стратегия поддержания высокого значения N_e – взять равные

¹ Процентный показатель всхожести и процентный показатель ожидаемого укоренения в поле выражаются десятичными дробями, т. е., 95% = 0,95.

² Процентный показатель укоренения растений обычно на 5% ниже процентного показателя всхожести в неблагоприятных условиях и на 1% ниже в хороших условиях.

количества семян из максимально большого количества материнских растений. Труднее проводить сбор самоопыляемых, чем перекрестно опыляемых видов. Если между растениями одного образца наблюдается разница по степени зрелости в период цветения и по зрелости, лучше собирать отдельные растения и смешивать в равных пропорциях семена с разных материнских растений во избежание материнского эффекта.

Для клонально размножающихся культур размер популяции не имеет такого значения, поскольку растения одного образца обычно являются генетически идентичными. Однако, у многих клонально размножающихся культур наблюдается высокий уровень гетерозиготности вследствие некоторого количества естественного перекрестного опыления, последствия которого далее закрепляются в вегетативных органах и могут восприниматься как изменчивость среди растений образца (Vasil et al. 1994; Lebot and Aradhya 1992). Таким образом, рекомендуется брать 5 – 10 растений на образец. Когда есть уверенность в генетической идентичности, важнее отобрать материал с небольшого количества здоровых и сильных материнских растений, чем с большого количества растений среднего качества. Таким образом, количество посаженных растений будет зависеть от уровня гетерозиготности, внутривидового разнообразия, а также от стоимости сохранения материала и необходимости проводить описание и оценку образца.

Выбор условий окружающей среды

Если существует такая возможность, образцы гермоплазмы следует размножать в экологических условиях региона, откуда эти образцы ведут свое происхождение. В качестве альтернативы можно выбрать такое место, где давление отбора на генотипы или популяции будет минимальным. При отсутствии приемлемых мест следует установить сотрудничество с другими организациями, способными обеспечить для размножения подходящее место или сооружения. В процессе размножения и последующего обращения с семенами и пропагулами следует избегать их засорения материалами с близкорасположенных делянок, свести к минимуму перенос генов и предотвращать случайное занесение трансгенов. Следует удалить растения, которые четко определены как загрязнитель (контаминант) и не относятся к популяции. Также, не следует сажать образцы культур на месте предыдущего их выращивания, чтобы снизить риск возникновения растений выросших самопроизвольно, а также накопления вредителей почвы и болезней.

Участки для размножения должны быть по мере возможности постоянными, с наличием хорошо налаженных водоканалов. Хорошая ирригация должна быть доступна даже для неорошаемых сельскохозяйственных культур, чтобы избежать выбора любого иного отбора культуры продиктованного засухой, а также обеспечить хороший урожай. Также, рекомендуется проведение оценки

почвы на наличие питательных веществ, чтобы определить необходимость в минеральном удобрении.

Изоляция

Большое значение имеет селекционная система определенных сельскохозяйственных культур. В случае с перекрестно опыляемыми видами, следует обеспечивать необходимое изолирующее расстояние, использовать временную изоляцию, укрывание изоляторами, изодомики и другие способы. Поскольку степень скрещивания у некоторых видов растений зависит от местности, в практику следует ввести проведение оценки степени скрещивания в том месте, где будет проводиться размножение растений, чтобы выбрать подходящую методику по скрещиванию.

Уход за посевами сельскохозяйственных культур

С практической точки зрения полезно содержать делянки, на которых проводят размножение, максимально очищенные от чужеродных семян и растений. Во избежание конкуренции между растениями, следует регулярно проводить прополку. В процессе подготовки делянок, от сорняков и переносимых с почвой вредителей и болезней следует избавляться при помощи специальной обработки, например, опрыскивания гербицидами, стерилизации почвы, обработки культиватором с последующим применением гербицидов и/или глубокой вспашки для уничтожения прорастающих сорняков.

Мониторинг подлинности образца

Каждый образец следует снабжать износостойкой этикеткой или надписью водостойкими чернилами, а также сохранять планы расположения полей для того, чтобы подлинность образца можно было наблюдать (мониторить) в течение вегетационного периода. Для семян сельскохозяйственных культур, рекомендуется иметь оригинальный образец семян для дальнейшей ссылки и хранить его в небольшом пластиковом мешке в сухом месте при 15°C. Когда бы ни проводилось размножение, свежесобранные семена могут сравниваться с образцом оригинальных семян, чтобы удостовериться в соответствии коллекционного образца типовому. Идентичность возобновленных семян или пропагул также можно проверить, сравнив с оригинальными описательными данными об индивидуальных признаках образца, если такие записи существуют.

Сбор урожая

В целом, урожай собирают в период оптимальной зрелости растения (после достижения физиологической зрелости), когда максимальное число семян уже созрело, способно переносить высушивание и может быть извлечено обмолачиванием с минимальными механическими повреждениями до того

момента, когда семена начнут портиться и распространяться естественным путем [для получения дополнительной информации – см. Rao *et al.* (2006)].

В случае с культурами, размножающимися клонированием, физиологическая зрелость материнского растения – наиболее важный критерий, определяющий время сбора отпрысков для успешного размножения или краткосрочного хранения. В большинстве случаев зрелость съедобной части растения обычно не имеет значения, если она не совпадает с размножаемой частью.

Распространенные вредители и болезни

В руководствах перечислены основные вредители и болезни каждой сельскохозяйственной культуры, однако перечень симптомов и способов борьбы далеко не полон. Во время размножения (включая сбор урожая и послеуборочный период) служба защиты растений должна освидетельствовать материал, в частности на предмет обнаружения болезней, переносимых семенами или вегетативными органами, чтобы обеспечить максимально возможное здоровье и жизнеспособность размноженного материала.

Список использованной и рекомендуемой для ознакомления литературы

- Crossa J. 1995. Sample size and effective population size in seed regeneration of monoecious plants. In: Engels JMM, Ramanatha RR, editors. Regeneration of seed crops and their wild relatives. Proceedings of a consultation Meeting 4-7 December 1995, ICRISAT, Hyderabad, India. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp.140–143.
- Crossa J, Hernandez CM, Bretting P, Eberhart SA, Taba S. 1993. Practical considerations for maintaining germplasm in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 673–678.
- Crossa J, Vencovsky R. 1994. Implications of the variance effective population size on the genetic conservation of monoecious species. *Theoretical and Applied Genetics* 89:936–942.
- Crossa J, Vencovsky R. 1997. Variance Effective Population Size for Two-Stage Sampling of Monoecious Species. *Crop Science* 37:14–26.
- Engels JMM, Visser L, editors. 2003. A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. IPGRI, Rome, Italy.
- FAO/IPGRI. 1994. Genebank standards. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- FAO. 1998. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Hanson J. 1985. Practical Manuals for Genebanks: Procedures for Handling Seeds in Genebanks. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.

- ISTA. 2008 International rules for seed testing. International Seed Testing Association. ISTA Secretariat, CH-Switzerland.
- Lebot V, Aradhya KM. 1992. Collecting and evaluating taro *Colocasia esculenta* for isozyme variation. FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter 90:47–49.
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D and Larinde M. 2006. Manual of seed handling in genebanks. Handbook for Genebanks No.8. Bioversity International, Rome, Italy.
- Reed BM, Engelmann F, Dulloo ME, Engels JMM. 2004. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. Handbook for Genebanks No 7. International Plant Genetics Resources Institute, Rome, Italy.
- Sackville Hamilton NR, Chorlton KH. 1997. Regeneration of accessions in seed collections: a decision guide. Handbook for Genebanks No.5. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Soest LJM van. 1990. Plant Genetic Resources: Safe for the future in genebanks. Impact of Science on Society 158: 107–120.
- Vasil IK, Thorpe TA, editors. 1994. Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht and Boston (Massachusetts). 604pp.
- Vencovsky R, Crossa J. 1999. Variance Effective Population Size under Mixed Self and Random Mating with Applications to Genetic Conservation of Species. Crop Science 39:1282–1294.

Оформление ссылки

Dulloo M.E., Hanson J., Jorge M.A., and Thormann I. 2008. Руководства по размножению генетических ресурсов: основные принципы. В: Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 9 pp.