

УДК 634.71 : 631.532/.535

UDC 634.71 : 631.532/.535

06.00.00 Сельскохозяйственные науки

Agricultural sciences

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПА И ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ РОСТА МИКРОПОБЕГОВ МАЛИНЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

EFFECT OF GENOTYPE AND NUTRIENT MEDIUM HORMONAL COMPOSITION ON INTENSITY OF PROPAGATION OF RASPBERRY *IN VITRO*

Иванова-Ханина Лидия Владимировна
к.с.-х.н.

e-mail: lidaivanova-khanina@rambler.ru

SPIN-код: 7419-6505

Академия биоресурсов и природопользования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Симферополь, Крым, Россия

Ivanova-Khanina Lidiia Vladimirovna
Cand.Agr.Sci.

e-mail: lidaivanova-khanina@rambler.ru

SPIN-code: 7419-6505

Academy of Life and Environmental Sciences of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «V. I. Vernadsky Crimean Federal University», Simferopol, Crimea, Russia

Этап собственно микроразмножения (мультипликации) является ключевым этапом процесса клонального микроразмножения растений, особенно многолетних, поскольку обеспечивает возможность увеличения коэффициента размножения растения. В работе рассматриваются возможности оптимизации данного этапа для клонального микроразмножения малины ремонтантных сортов. В результате проведенных исследований установлено, что уровень регенерации микропобегов малины на этапе мультипликации достаточно высокий и составляет 78,5–96 %. Подобрана наиболее универсальная модификация питательной среды МС, содержащая БАП и ГК (по 0,5 мг/л). Частота регенерации при культивировании на данной среде в зависимости от генотипа варьирует в пределах 79,0–94,0 %, высота микропобегов составляет 24,8–32,7 мм, а количество сформированных побегов – 1,2–2,2 шт. Установлено, что оптимальная продолжительность цикла выращивания на этапе собственно микроразмножения составляет 30 суток, при этом коэффициент размножения достигает 6,6–7,8 в зависимости от генотипа

The key stage of clonal micropropagation, the micropropagation *sensu stricto*, affords to increase the propagation index for plants, especially perennials. In this study, we consider ways to optimize clonal micropropagation of remontant raspberry cultivars. It is found that microsprout regeneration rate is 78,5–96,0 % on the multiplication *s. str.* stage. The most multipurpose nutrient medium is selected with containing 0,5 mg/l both of BAP and GK. When one uses this medium, regeneration rate runs 79,0–94,0% depending on genotype with sprout high running 24,8–32,7 mm and sprout number – 1,2–2,2 per node. The optimal duration of growing cycle is 30 days with the propagation index within 6,6–7,8, depending of genotype

Ключевые слова: КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ, МАЛИНА, ЭКСПЛАНТ, МИКРОПОБЕГИ, КУЛЬТУРА *IN VITRO*, ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА

Keywords: CLONAL MICROPROPAGATION, RASPBERRY, EXPLANTS, MICRO SPROUTS, CULTURE *IN VITRO*, A NUTRIENT MEDIUM

Выращивание малины, особенно ремонтантных сортов, обеспечивающих поступление ягод в течение всего курортного сезона – с начала июня и до конца октября, представляет большой интерес для экономики сельского хозяйства Крыма. В то же время, получение <http://ej.kubagro.ru/2015/04/pdf/73.pdf>

посадочного материала ягодных культур на территории Крыма сдерживается климатическими факторами, в связи с чем актуальным стал вопрос возможности использования биотехнологических методов, в частности, клонального микроразмножения растений в культуре *in vitro* [1, 2]. Этот метод характеризуется высоким коэффициентом размножения (до $1 : 10^7$), что позволяет в короткие сроки внедрять новые высокопродуктивные сорта в производство. Достижение высоких коэффициентов размножения осуществляется на этапе собственно микроразмножения несколькими путями: 1) снижением апикального доминирования и стимуляцией развития боковых побегов; 2) микрочеренкованием побега; 3) созданием условий для формирования адвентивных побегов тканями стебля основного побега [3, 4].

Коэффициент размножения в культуре *in vitro* зависит от совокупности факторов: генотипа растения, состава питательной среды, физических условий культивирования, стабильности процесса размножения при субкультивировании побегов [5]. Таким образом, для обеспечения высоких коэффициентов размножения растений важным является вопрос оптимизации биотехнологических приемов на этапе собственно микроразмножения (мультипликации). Особенно актуальными являются возможности увеличения коэффициента размножения для многолетних растений, в том числе и для ягодных [5, 6].

Целью наших исследований являлось выявить особенности роста и развития микропобегов малины на этапе собственно микроразмножения и подобрать оптимальный гормональный состав питательной среды.

Постановка и решение задачи.

Материалом для исследований служили растения малины (*Rubus idaeus* L.) ремонтантных сортов 'Брусвяна', 'Брусилловский стандарт', 'Примара', 'Joan J', характеризующихся комплексом ценных признаков.

При проведении экспериментальной работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных клеток, тканей и органов растений [4, 7, 8]. Культивирование эксплантов осуществляли на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС), содержащей 2 % сахарозы и 0,7 % агара. Для инициации морфогенетических процессов в качестве регуляторов роста использовали 6-бензиламинопурин (БАП) и гибберелловую кислоту (ГК) в различных концентрациях. Условия культивирования: температура 24–26 °С, относительная влажность воздуха 60–70 %, 16-ти часовой фотопериод и освещенность 2,0–3,0 тыс. люкс.

Для размножения использовали регенерировавшие в условиях *in vitro* из верхушечных и пазушных почек микропобеги малины. Отбор растений, пригодных для микрочеренкования, осуществляли визуально, оценивая высоту основного побега, количество дополнительно сформированных побегов и состояние питательной среды. Растения-регенеранты извлекали из пробирок и перемещали в чашки Петри, где разделяли на сегменты длиной 6–10 мм с одним-двумя междоузлиями, которые использовали для посадки на свежую питательную среду. При перемещении эксплантов на питательную среду контролировали, чтобы нижняя часть микрочеренка была погружена в питательную среду, для чего у некоторых микрочеренков отсекали нижние листья. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакет прикладных программ Excel 7.0 для Microsoft Windows®.

Основная задача на втором этапе клонального микроразмножения растений состоит в получении максимального количества микроклонов, что позволяет существенно снизить себестоимость полученных растений-регенерантов. Интенсивный рост и развитие микропобегов сортов 'Брусвяна' и 'Брусиловский стандарт', отмеченные на первом этапе микроразмножения, позволяют перейти ко второму этапу микроразмножения уже через 30 суток после введения почек в культуру *in*

in vitro, поскольку за этот период из одной почки формируется 1,8–2,4 побега высотой 26,5–30,0 мм [2, 9]. Увеличение длительности культивирования повышает риск травмирования нежных тканей побегов при извлечении их из пробирки. Микрочеренки, полученные при разделении основного и дополнительных побегов на сегменты длиной 6–10 мм с одним-двумя междоузлиями помещали на свежие питательные среды, дополненные регуляторами роста группы цитокининов и гиббереллинов. В результате проведенных исследований отмечено, что частота регенерации побегов малины на втором этапе микроразмножения была высокой и варьировала от 78,5 до 96,0 % в зависимости от генотипа и концентрации экзогенных гормонов (рис. 1).

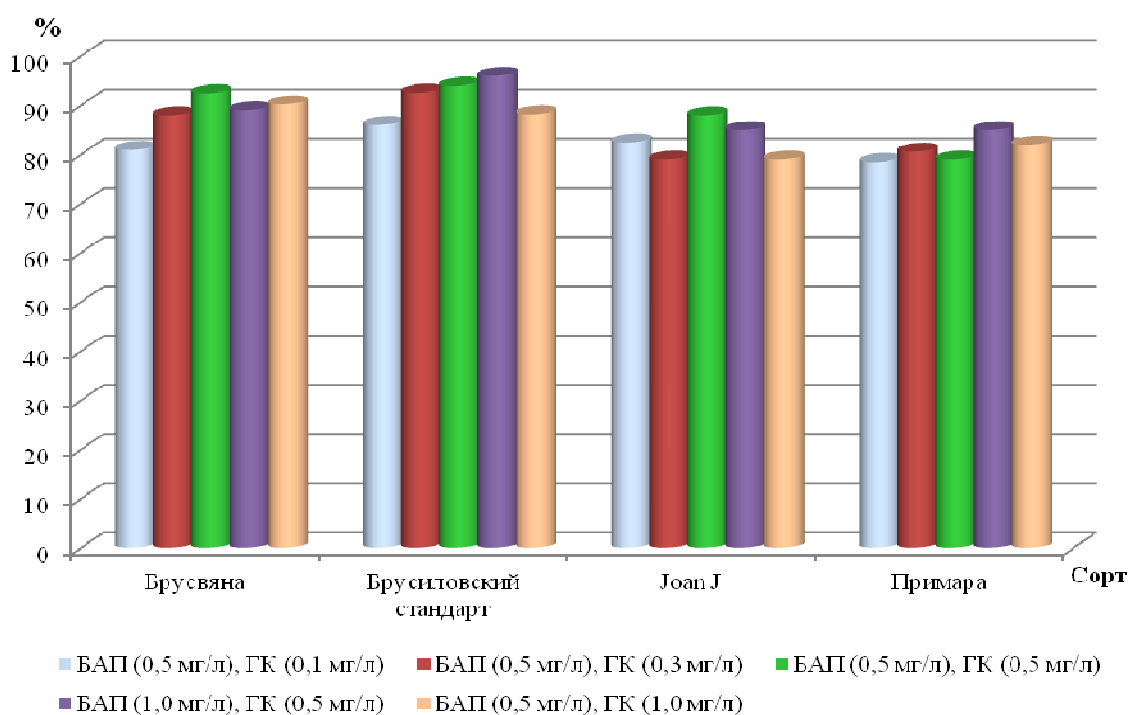


Рисунок 1. Уровень регенерации микрочеренков исследуемых сортов малины при изменении гормонального состава питательной среды

Уровень регенерации микропобегов малины сортов 'Брусвяна' и 'Жоан J' был наиболее высоким при добавлении в питательную среду БАП и ГК в равном соотношении (0,5 мг/л) и составил 92,5 % и 88,0 %

соответственно. Для микропобегов сорта 'Брусиловский стандарт' оптимальным является вариант питательной среды, содержащий БАП в концентрации 0,5 мг/л и ГК 0,3 мг/л, увеличение концентрации регуляторов роста не оказывало существенного влияния на уровень регенерации. Частота регенерации микропобегов сорта 'Примара' варьировала от 78,5 % до 85,0 %, при этом разница между вариантами была статистически не доказуема.

Выявлено, что у сортов 'Брусвяна' и 'Брусиловский стандарт' наряду с интенсивным ростом основного побега, происходило формирование и развитие одного-двух дополнительных побегов, тогда как сорта 'Joan J' и 'Примара' характеризовались меньшей побегообразовательной способностью (табл.).

Таблица – ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ МИКРОПОБЕГОВ МАЛИНЫ НА ЭТАПЕ СОБСТВЕННО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ (30 сут. культивирования)

Содержание и концентрация гормонов, мг/л	Параметры роста сортов			
	Брусвяна	Брусиловский стандарт	Joan J	Примара
1	2	3	4	5
Количество побегов, шт.				
БАП 0,5 ГК 0,1	1,6±0,5	2,0±0,3	1,3±0,8	1,4±0,2
БАП 0,5 ГК 0,3	1,8±0,3	1,8±0,7	1,0±0,5	1,6±0,5
БАП 0,5 ГК 0,5	2,2±0,5	2,1±0,8	1,2±0,6	1,6±0,2
БАП 1,0 ГК 0,5	2,4±0,8	2,4±1,0	2,1±0,6	1,4±0,6
БАП 0,5 ГК 1,0	2,2±0,5	1,8±0,5	1,4±0,2	1,3±0,4
Высота основного побега, мм				
БАП 0,5 ГК 0,1	25,4±1,6	18,7±1,4	25,6±1,2	18,2±0,4
<i>Продолжение таблицы</i>				
1	2	3	4	5
БАП 0,5 ГК 0,3	28,4±1,4	22,2±0,9	26,2±1,4	22,2±0,7
БАП 0,5 ГК 0,5	32,7±0,8	27,3±1,1	32,4±2,2	24,8±1,1
БАП 1,0 ГК 0,5	33,3±2,3	27,7±0,9	33,6±1,4	19,4±0,8
БАП 0,5 ГК 1,0	28,6±1,2	25,6±1,0	28,5±1,5	21,4±0,8

Высота микропобегов исследуемых сортов малины варьировала в зависимости от генотипа и гормонального состава питательной среды. Так, у сорта 'Брусвяна' наибольшей высотой характеризовались побеги при культивировании на питательной среде с добавлением БАП (0,5 и 1,0 мг/л) и ГК (0,5 мг/л). При этом между этими вариантами не было существенных

различий, повышение концентрации БАП до 1,0 мг/л не способствовало и достоверно значимому увеличению количества дополнительных побегов.

Аналогичная тенденция прослеживается и у сортов 'Брусилковский стандарт' и 'Joan J' – увеличение концентрации БАП и ГК до 1,0 мг/л не оказывало существенного влияния ни на высоту, ни на образование дополнительных побегов. Для сорта 'Примара' оптимальным также является вариант питательной среды с содержанием БАП (0,5 мг/л) и ГК (0,5 мг/л). Повышение концентрации БАП до 1,0 мг/л приводило к некоторому снижению показателей роста микропобегов этого сорта. Аналогичная тенденция была отмечена при повышении концентрации БАП с 0,5 мг/л до 1,0 мг/л на фоне ИУК (0,1 мг/л) при культивировании сортов малины Новость Кузьмина и Барнаульская [10].

Выявлено, что увеличение концентрации ГК в питательной среде до 1,0 мг/л на фоне оптимальной концентрации БАП (0,5 мг/л) способствует увеличению высоты микропобегов за счет формирования более длинных междоузлий, но количество узлов и, соответственно, последующий выход микрочеренков ниже, чем в остальных вариантах.

Для определения оптимальной длительности культивирования микропобегов и коэффициента размножения подсчитывали количество узлов, формируемых эксплантом в течение одного цикла выращивания. Микрочеренки помещали на модифицированную нами питательную среду МС, содержащую БАП и ГК (по 0,5 мг/л). Полученные данные по динамике формирования узлов на микропобегах малины представлены на рисунке 2.

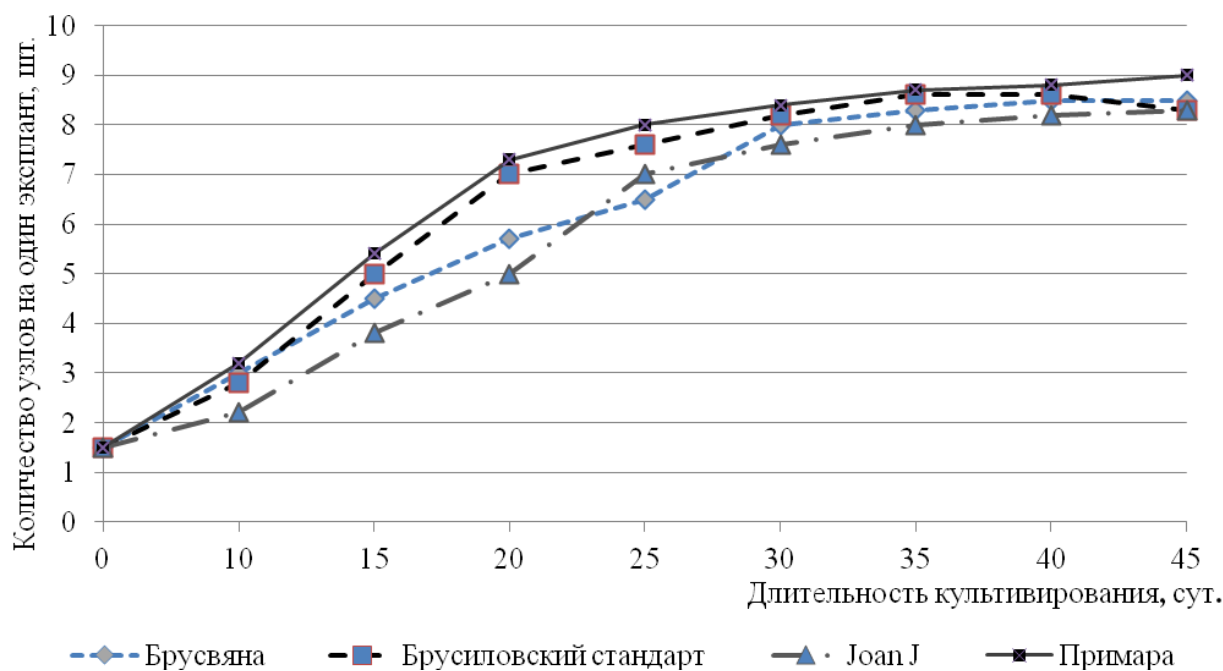


Рисунок 2. Влияние длительности культивирования на интенсивность формирования узлов микропобегами малины

Полученные результаты показали, что в процессе культивирования *in vitro* у всех изучаемых сортов наблюдалось увеличение коэффициента размножения до определенного периода, в зависимости от сорта. Культивирование микрочеренка в течение первых 5 суток способствовало некоторому утолщению базальной части экспланта, пробуждению пазушной почки, после чего отмечался интенсивный рост микропобега. В зависимости от сорта количество сформированных в течение первых 15-ти суток культивирования узлов составляло 4,5–5,2 шт., за последующие 15 суток значение этого параметра увеличивалось в 1,6–1,8 раза и составляло 8,0–8,4 шт. При этом у всех исследуемых сортов интенсивность роста микропобегов и формирования узлов была практически на одном уровне. Увеличение периода культивирования до 45 суток приводило к незначительному увеличению числа узлов в 0,8 раза.

Таким образом, у всех исследуемых сортов было отмечено интенсивное формирование узлов в первые 30 суток культивирования с

постепенным снижением количества формируемых узлов при увеличении длительности культивирования до 45 суток. Поскольку такая реакция микропобегов на длительность культивирования вполне соответствовала S-образной кривой роста, то более длительное культивирование было теоретически не обоснованным и не использовалось в эксперименте.

Коэффициент размножения рассчитывался с учетом частоты регенерации микропобегов и количества узлов, сформированных основным и дополнительными побегами одного экспланта. Коэффициент размножения составил: у сорта 'Брусвяна' – 7,6, 'Брусиловский стандарт' – 7,8, 'Joan J' – 7,1, 'Примара' – 6,6.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены морфогенетические особенности исследуемых сортов малины на этапе собственно микроразмножения и подобрано оптимальное соотношение гормонов в питательной среде для обеспечения высокой эффективности процесса клонального микроразмножения.

Выводы:

1. Уровень регенерации микропобегов исследуемых сортов малины на этапе собственно микроразмножения достаточно высокий и составляет 78,5–96,0 %.

2. Установлено, что на этапе собственно микроразмножения наиболее универсальной является питательная среда с добавлением БАП и ГК в равной концентрации (по 0,5 мг/л). Частота регенерации при культивировании на данной среде в зависимости от генотипа варьирует в пределах 79,0–94,0 %, высота микропобегов составляет 24,8–32,7 мм, а количество сформированных побегов – 1,2–2,2 шт.

3. Оптимальная продолжительность цикла выращивания на этапе собственно микроразмножения составляет 30 суток, при этом коэффициент размножения варьирует от 6,6 до 7,8 в зависимости от генотипа.

Список литературы

1. Копылов В. И., Шевченко В. В., Щербатко Н. М. Плодоводство Крыма в XXI веке // Агропромышленный комплекс Крыма в XXI веке : науч. труды КГАУ. – Вып. 68. – Симферополь, 2002. – С. 68–77.
2. Иванова-Ханина Л. В. Оптимизация условий введения малины и ежевики в культуру *in vitro* // Научный журнал КубГАУ, № 101 (07). – 2014. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2014/07/pdf/25.pdf>
3. Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
4. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
5. Высоцкий В. А. Клональное микроразмножение растений // Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – С. 91–101.
6. Вовк В. В. Оптимизация селекционного процесса и ускоренного размножения межвидовых ремонтантных форм малины методом *in vitro* : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.05 / Вовк Владимир Владимирович. – Брянск, 2000. – 20 с.
7. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
8. Kartha K. K. Meristem culture : Plant tissue culture methods [Eds. O.L. Gamborg, L.R. Wetter]. –Saskatoon: N.R.C. Canada, 1975. – P. 39–43.
9. Иванова-Ханина Л. В. Влияние гормонального состава питательной среды на интенсивность роста малины в культуре *in vitro* // Вісник аграрної науки Причорномор'я. – 2013. – Вип. 3. – С. 128–135.
10. Оразбаева Г. К. Клональное размножение растений красной малины (*Rubus idaeus* L.) *in vitro* // Вестник науки КазАТУ им. С.Сейфуллина. – 2012. - №1 (72). – С. 140–149.

References

1. Kopylov V. I., Shevchenko V. V., Shherbatko N. M. Plodovodstvo Kryma v XXI veke // Agropromyshlennyj kompleks Kryma v XXI veke : nauch. trudy KGAU. – Vyp. 68. – Simferopol', 2002. – S. 68–77.
2. Ivanova-Hanina L. V. Optimizacija uslovij vvedenija maliny i ezheviki v kul'turu in vitro // Nauchnyj zhurnal KubGAU, № 101 (07). – 2014. – Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2014/07/pdf/25.pdf>
3. Kataeva N. V., Butenko R. G. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij. – M.: Nauka, 1983. – 96 s.
4. Kalinin F. L., Sarnackaja V. V., Polishhuk V. E. Metody kul'tury tkanej v fiziologii i biohimii rastenij. – K.: Naukova dumka, 1980. – 488 s.
5. Vysockij V. A. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij // Kul'tura kletok rastenij i biotehnologija. – M.: Nauka, 1986. – S. 91–101.
6. Vovk V. V. Optimizacija selekcionnogo processa i uskorennoe razmnozhenie mezhvidovyh remontantnyh form maliny metodom in vitro : avtoref. dis. ... kand. s.-h. nauk : 06.01.05 / Vovk Vladimir Vladimirovich. – Brjansk, 2000. – 20 s.
7. Butenko R. G. Kul'tura izolirovannyh tkanej i fiziologija morfogeneza rastenij. – M.: Nauka, 1964. – 272 s.
8. Kartha K. K. Meristem culture : Plant tissue culture methods [Eds. O. L. Gamborg, L. R. Wetter]. –Saskatoon: N.R.C. Canada, 1975. – P. 39–43.

9. Ivanova-Hanina L. V. Vlijanie gormonal'nogo sostava pitatel'noj sredy na intensivnost' rosta maliny v kul'ture in vitro // Visnik agrarnoi nauki Prichornomor'ja. – 2013. – Vip. 3. – S. 128–135.

10. Orazbaeva G.K. Klonal'noe razmnozhenie rastenij krasnoj maliny (Rubusidaeus L.) in vitro // Vestnik nauki KazATU im. S.Sejfullina. – 2012. – №1 (72). – S.140–149.