

УДК 573.6:634.11:631.53

UDC 573.6:634.11:631.53

06.00.00 Сельскохозяйственные науки

Agriculture

ВОЗДЕЙСТВИЕ РАНЕЕ НЕ ПРИМЕНЯВШИХСЯ В КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА МИКРОПОБЕГИ СЛИВЫ *IN VITRO*

IMPACT OF GROWTH REGULATORS WHICH WERE NOT USED EARLIER IN CLONAL MICROPROPAGATION ON MICROSHOOTS OF PLUM *IN VITRO*

Бунцевич Леонид Леонтьевич
канд. биол. наук
SPIN-код 2314-5652

Buntsevich Leonid Leontievich
Cand.Biol.Sci.
SPIN-code 2314-5652

Киян Андрей Тимофеевич
д-р с.-х. наук
SPIN-код 2322-2555
Беседина Екатерина Николаевна
SPIN-код 2082-2580

Kiyan Andrey Timofeevich
Dr.Sci.Agr.
SPIN-code 2322-2555

Besedina Ekaterina Nikolaevna
SPIN-code 2082-2580

Костюк Марина Александровна
SPIN-код 4914-5332
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, Краснодар, Россия

Kostyuk Marina Aleksandrova
SPIN-code 4914-5332
Federal State Budget Scientific Organization «North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture», Krasnodar, Russia

Представлены результаты оценки эффективности в регенерации микропобегов сливы ранее не применявшихся в культуре *in vitro* негормональных препаратов с высокой физиологической активностью (препараты, полученные при производстве фурфурола, а также производные и композиции органических кислот), сравнение их воздействия с воздействием традиционно используемых в клональном микроразмножении регуляторов роста. Препараты, изученные в технологии клонального микроразмножения сливы, получены при переработке отходов с.-х. производства. В работе использованы методики: способ клонального микроразмножения растений *in vitro*, статистическая обработка данных методом дисперсионного анализа. Объектами исследований послужили микропобеги сливы сорта Стенли. Установили, что на средах с препаратами «Универсальный», сукцинат натрия, сукцинат калия, янтарная кислота, Л-1 развиваются здоровые, крупные, интенсивно окрашенные микропобеги сливы, превосходящие по морфометрическим параметрам контроль (среда с БАП 1 мг/л, ИМК 0,1 мг/л, ГК 0,5 мг/л). Препараты «Универсальный», сукцинат натрия, сукцинат калия, янтарная кислота, Л-1 в концентрации 4,0 мг/л проявили себя как регуляторы роста, благоприятно влияющие на регенерацию эксплантов и качественное состояние микропобегов сливы

The article presents results of the assessment of the efficiency of non-hormonal preparations which were not earlier applied in culture *in vitro* with high physiological activity (the preparations received by production of furfural, and also derivatives and compositions of organic acids) during regenerations of microshoots of plum, comparison of their influence with influence of growth regulators which are traditionally used in clonal micropropagation. These experimental preparations were received when processing waste of agricultural production. In this work we used: technology of clonal micropropagation of plants of *in vitro*, statistical data processing by method of the dispersive analysis. The objects of researches were microshoots of plum of a Stanley variety. We have established that on mediums with the preparations "Universal", sodium succinate, potassium succinate, amber acid, L-1 the large, intensively colored plum microshoots develop surpassing control (medium with BAP of 1 mg/l, IBA of 0,1 mg/l, gibberellic acid of 0,5 mg/l) in morphometric parameters. Thus, the preparations "Universal", sodium succinate, potassium succinate, amber acid, L-1 in concentration of 4,0 mg/l proved as the growth factors which are favorably influencing on plantlets' regeneration and a qualitative condition of microshoots of plum

Ключевые слова: РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА, РЕГЕНЕРАЦИЯ И МУЛЬТИПЛИКАЦИЯ МИКРОПОБЕГОВ, ЭКСПЛАНТЫ, КУЛЬТУРА

Keywords: GROWTH SUBSTANCES, SHOOT REGENERATION AND MULTIPLICATION, PLANTLETS, *IN VITRO* CULTURE, PLUM

IN VITRO, СЛИВА

Метод клонального микроразмножения растений является в настоящее время ведущим методом оздоровления растений от хронических инфекций, одновременно решающим такие задачи, как повышение урожайности, генетической однородности, получение в короткий срок большого количества посадочного материала, планирование производства растений к назначенному сроку, обмен ценным генетическим материалом в мировом сообществе без риска занести карантинные заболевания и вредителей, хранение растений длительное время без контакта с внешними условиями среды [1-6].

Однако, в технологии клонального микроразмножения существует ряд прикладных проблем, к которым относятся в частности, высокие затраты на препараты ростовых веществ. Совершенно очевидно, что решить проблему высокой стоимости стандартных ростовых веществ (БАП, ГК) можно путём подбора регуляторов роста с близкой ростовой активностью и низкой рыночной стоимостью.

В обозначенном контексте целью исследования явилось определение эффективности для регенерации микропобегов ранее не применявшихся в культуре *in vitro* препаратов с ростовой активностью (препараты, полученные при производстве фурфурола, а также производные и композиции органических кислот), сравнить их воздействие с воздействием традиционно используемыми в клональном микроразмножении регуляторами роста.

Экспериментальные препараты - это негормональные вещества с высокой физиологической активностью, которые в полевых условиях стимулируют рост и развитие растений зерновых, плодово-ягодных, овощных и др. культур, повышают их продуктивность, ускоряют плодоношение, активируют иммунитет и устойчивость к стрессорным факторам внешней среды [7, 8].

Методика проведения исследований

Клональное микроразмножение провели согласно методикам Высоцкого [1], Джигадло [2], Корнацкого С.А. [9], Муратовой С. А. [10]. Для введения в культуру *in vitro* отбирались верхушечные почки с черенков сливы сорта Стенли. В культуру *in vitro* вводились экспланты размером 3-4 мм, которые располагали в культивационных сосудах так, чтобы они соприкасались абаксиальной частью со средой.

При клональном микроразмножении сливы *in vitro* применяли минеральные основы сред по прописи Мурасиге-Скуга. Среды автоклавировали при температуре 120 °С и давлении 1 атм в течение 20 мин в вертикальных автоклавах ВК-30. Все работы по стерилизации и плановые пересадки растительного материала осуществляли в ламинар-боксе С-1,2 (код 110.120).

Культивирование микропобегов осуществляли в условиях стандартного фотопериода 16/8 (день - 16 часов, ночь - 8 часов), освещенности 2500-3000 люкс, температуре $+23\pm 3$ °С и влажности 50-60 %. Каждые 30-40 суток проводили субкультивирование новых побегов на свежую питательную среду.

Регенерированы микропобеги трёх партий эксплантов в количестве 150 шт. каждая. Введение в культуру *in vitro* проводили для первой партии в первой декаде апреля, для второй – во второй декаде этого же месяца, для третьей – в третьей декаде апреля.

В качестве регуляторов роста были испытаны следующие препараты: «Кавказ» (кротонолактон 35 %), сукцинат калия, сукцинат натрия, янтарная кислота, препарат «Универсальный», Л-1, фуролан в концентрации 4,0 мг/л. (концентрация выбрана на основе результатов исследований в культуре *in vitro* яблони [11]).

Характеристика испытанных соединений приведена в таблице 1. Контрольным вариантом послужила среда МС с БАП 1 мг/л, ИМК 0,1 мг/л и ГК 0,5 мг/л.

Таблица 1 – Характеристика экспериментальных препаратов

№	Шифр или тривиальное название	Состав
1	Л-1	2-метил-2,5-диэтокси-2,5-дигидрофуран
2	Янтарная кислота	97,5 %-ная 1,4-бутандиовая кислота
3	Сукцинат калия	дикалиевая соль янтарной кислоты
4	Сукцинат натрия	динатриевая соль янтарной кислоты
5	«Кавказ»	35 %-ный 2-(5Н) -фуранон
6	«Универсальный»	85 %-ная 1,4-бутандиовая кислота (янтарная кислота)

Ростовые вещества изучены в следующих вариантах:

- 1) среда МС, 1 мг/л БАП, ИМК 0,1 мг/л и 0,5 мг/л ГК (стандарт);
- 2) среда МС, 4,0 мг/л сукцината калия;
- 3) среда МС, 4,0 мг/л сукцината натрия;
- 4) среда МС, 4,0 мг/л янтарной кислоты.
- 5) среда МС, 4,0 мг/л «Кавказ» (кротонолактон 35%);
- 6) среда МС, 4,0 мг/л «Универсальный»;
- 7) среда МС, 4,0 мг/л Л-1.

Результаты статистически обработаны методом дисперсионного анализа по Доспехову [12].

Результаты и обсуждение

В ходе изучения ростовой активности экспериментальных соединений в культуре *in vitro* сливы учитывались такие показатели качества, как число листьев на микропобег, высота микропобегов, относительное количество витрифицированных микропобегов. Результаты регенерации микропобегов из эксплантов сливы *in vitro* приведены в таблице 2 и на рис. 1.

Таблица 2 – Показатели развития регенерированных из эксплантов *in vitro* микропобегов сливы сорта Стенли на питательных средах МС с различными стимуляторами роста

Стимулятор роста	1 партия			2 партия			3 партия			В среднем по партиям		
	Число листьев на микропобег, шт., в среднем	Витрификация, %, в среднем	Высота микропобегов, мм, в среднем	Число листьев на микропобеге, шт., в среднем	Витрификация, %, в среднем	Высота микропобегов, мм, в среднем	Число листьев на микропобеге, шт., в среднем	Витрификация, %, в среднем	Высота микропобегов, мм	Число листьев на микропобеге, шт.	Витрификация, %	Высота микропобегов, мм
БАП 1 мг/л, ИМК 0,1 мг/л., ГК 0,5 мг/л (st)	3,6	35	8,1	2,9	35	7,5	3,1	35	8,4	3,2	35	8,0
Сукцинат калия 4,0 мг/л	3,9	0	11,9	3,5	0	8,1	3,7	0	10,6	3,7	0	10,2
Сукцинат натрия 4,0 мг/л	4,6	0	14,0	4,9	0	13,3	4,3	0	13,6	4,6	0	13,6
Янтарная кислота 4,0 мг/л	4,4	0	11,8	3,8	0	12,1	4,3	0	11,9	4,2	0	12,0
«Универсальный» 4,0 мг/л	5,8	0	14,1	6,8	0	14,4	6,1	0	14,3	6,2	0	14,3
«Кавказ» 4,0 мг/л	3,8	0	9,8	3,4	0	9,1	3,6	0	9,3	3,6	0	9,4
Л-1 4,0 мг/л	3,5	10	10,2	4,4	10	9,4	4,1	10	9,3	4,0	0	9,6
								НСР ₀₅		0,5		1,2

Как видно из таблицы, максимальное количество листьев на микропобег развивается у эксплантов сливы сорта Стенли на средах с препаратом «Универсальный» (6,2 шт.) и сукцинат натрия (4,6 шт.), на этих же средах микропобеги достигают максимальной высоты (14,3 мм и 13,6 мм соответственно), различие с контролем по обоим показателям существенно. По количеству образовавшихся листьев существенно с контролем раз-

личаются микропобеги на средах с препаратами янтарная кислота, сукцинат калия, Л-1 (4,2; 4,0; 3,7 шт., контроль 3,2 шт.).



Рисунок 1 – Микропобеги сливы сорта Стенли на средах МС с различными регуляторами роста: слева направо: янтарная кислота 4,0 мг/л; БАП 1 мг/л, ИМК 0,1 мг/л., ГК 0,5 мг/л (стандарт); сукцинат калия 4,0 мг/л г/л; сукцинат натрия 4,0 мг/л.

Среды с препаратом «Кавказ» по количеству образовавшихся листьев на микропобег превосходят контроль, но существенно с ним не различаются (3,6; листьев, контроль 3,2 листа).

По показателю «высота микропобегов» существенно с контролем различаются все испытанные препараты: янтарная кислота, сукцинат калия, Л-1, «Кавказ» (12,0; 10,2; 9,6; 9,4 мм соответственно, контроль 8,0 мм).

На средах со всеми испытуемыми препаратами не наблюдается витрифицированных побегов, в то время как на контрольной среде (БАП 1 мг/л, ИМК 0,1 мг/л, ГК 0,5 мг/л) 35% микропобегов витрифицированы.

Выводы

На средах с препаратами «Универсальный», сукцинат натрия, сукцинат калия, янтарная кислота, Л-1 развиваются крупные, интенсивно окра-

шенные микропобеги сливы, превосходящие по морфометрическим параметрам контроль (среда с БАП 1 мг/л, ИМК 0,1 мг/л, ГК 0,5 мг/л).

Таким образом, препараты «Универсальный», сукцинат натрия, сукцинат калия, янтарная кислота, Л-1 в концентрации 4,0 мг/л проявили себя как регуляторы роста, благоприятно влияющие на регенерацию эксплантов и качественное состояние микропобегов сливы *in vitro*. Специфического направления активности (цитокининовой, ауксиновой и др.) экспериментальных препаратов в культуре *in vitro* не выявлено.

Литература

1. Высоцкий, В.А. Рекомендации по выращиванию безвирусного посадочного материала плодово-ягодных культур и винограда. - М.: Колос, 1980. – 37 с.
2. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / под ред. Е.Н. Джигадло. – Орёл: ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 50 с.
3. Бунцевич Л.Л., Захарова М.В., Костюк М.А., Данилюк Ю.П., Захарченко Р.С. Вирусные и вирусоподобные болезни плодовых культур и оздоровление растений способом клонального микроразмножения *in vitro* / отв. ред. Э. В. Макарова. // В сборнике: Проблемы интенсивного садоводства: материалы Расширенного заседания Ученого совета, посвященного 100-летию со дня рождения д-ра с.-х. наук Трусевича Г.В. - Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2010. - С. 191-193.
4. Луговской А.П., Артюх С.Н., Алехина Е.М., Щеглов С.Н., Дорошенко Т.Н., Причко Т.Г., Ульяновская Е.В., Бунцевич Л.Л. Технология комбинационной и клоновой селекции сортов плодовых культур // В книге: Интенсивные технологии возделывания плодовых культур - Краснодар, 2004. - С. 127-203.
5. Егоров Е.А., Луговской А.П., Бунцевич Л.Л. Проблемы производства безвирусного посадочного материала плодовых культур на юге России // В сборнике: Садоводство и виноградарство 21 века: материалы Международной научно-практической конференции. - 1999. - С. 213-223.
6. Тимофеева О.А. Румянцева Н.И. Культура клеток и тканей растений. - Казань, 2012 - 91 с.
7. Ненько Н.И., Латашко В.М., Бадовская Л.А., Бадалян Е.К. Изучение влияния препарата Универсальный на химический состав соломины яровой пшеницы сорта Спектр // Регуляторы роста и развития растений: Сб. тез. докл. V междунар. конф.- М., 1999. С. 120.
8. Ненько Н.И. Действие на растения регуляторов роста, синтезированных на основе фурфурола: автореф. дисс. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.09 / Ненько Наталия Ивановна. – Краснодар, 1999. - 48 с.
9. Корнацкий, С.А. Особенности клонального микроразмножения сливы в системе производства оздоровленного посадочного материала: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07 / Корнацкий Сергей Аркадьевич. – М., 1991. – 24 с.

10. Муратова, С.А. Индукция морфогенеза в культуре соматических тканей сливы домашней *Prunus domestica* L.: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Муратова Светлана Александровна. – Мичуринск, 2002. – 186 с.

11. Беседина, Е.Н. Бунцевич Л.Л., Костюк М.А. Изучение эффективности новых стимуляторов роста различной природы при клональном микроразмножении подвоев яблони серии СК // Плодоводство и ягодоводство России. - 2014. - Т. XXXIX. - С. 29-32

12. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) — 5-е изд., доп. и перераб.—М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.

References

1. Vysockij, V.A. Rekomendacii po vyrashhivaniju bezvirusnogo posadochnogo materiala plodovo-jagodnyh kul'tur i vinograda. - M.: Kolos, 1980. – 37 s.

2. Metodicheskie rekomendacii po ispol'zovaniju biotehnologicheskikh metodov v rabote s plodovymi, jagodnymi i dekorativnymi kul'turami / pod red. E.N. Dzhigad-lo. – Orjol: GNU VNIISPK, 2005. – 50 s.

3. Bunceovich L.L., Zaharova M.V., Kostjuk M.A., Daniljuk Ju.P., Zaharchenko R.S. Virusnye i virusopodobnye bolezni plodovyh kul'tur i ozdorovlenie rastenij sposobom klonal'nogo mikrorazmnozhenija in vitro / otv. red. Je. V. Makarova. // V sbornike: Problemy intensivnogo sadovodstva: materialy Rasshirenogo zasedanija Uchenogo soveta, posvjashhennogo 100-letiju so dnja rozhdenija d-ra s.-h. nauk Trusevicha G.V. - Krasnodar: GNU SKZNIISiV, 2010. - S. 191-193.

4. Lugovskoj A.P., Artjuh S.N., Alehina E.M., Shheglov S.N., Doroshenko T.N., Prichko T.G., Ul'janovskaja E.V., Bunceovich L.L. Tehnologija kombinacionnoj i klonovoj selekcii sortov plodovyh kul'tur // V knige: Intensivnye tehnologii vozdeľvanija plodovyh kul'tur - Krasnodar, 2004. - S. 127-203.

5. Egorov E.A., Lugovskoj A.P., Bunceovich L.L. Problemy proizvodstva bezvirusnogo posadochnogo materiala plodovyh kul'tur na jube Rossii // V sbornike: Sadovodstvo i vinogradarstvo 21 veka: materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii. - 1999. - S. 213-223.

6. Timofeeva O.A. Rumjanceva N.I. Kul'tura kletok i tkanej rastenij. - Kazan', 2012 - 91 s.

7. Nen'ko N.I., Latashko V.M., Badovskaja L.A., Badaljan E.K. Izuchenie vlijanija preparata Universal'nyj na himicheskij sostav solominy jarovoj pshenicy sorta Spektr // Reguljatory rosta i razvitija rastenij: Sb. tez. dokl. V mezhdunar. konf.- M., 1999. S. 120.

8. Nen'ko N.I. Dejstvie na rastenija reguljatorov rosta, sintezirovannyh na osnove furfurola: avtoref. diss. ... d-ra s.-h. nauk: 06.01.09 / Nen'ko Natalija Iva-novna. – Krasnodar, 1999. - 48 s.

9. Kornackij, S.A. Osobennosti klonal'nogo mikrorazmnozhenija slivy v si-steme proizvodstva ozdorovlennogo posadochnogo materiala: avtoref. dis. ... kand. s.-h. nauk: 06.01.07 / Kornackij Sergej Arkad'evich. – M., 1991. – 24 s.

10. Muratova, S.A. Indukcija morfogenez v kul'ture somaticheskikh tkanej sli-vy domashnej *Prunus domestica* L.: dis. ... kand. biol. nauk: 03.00.23 / Muratova Svetlana Aleksandrovna. – Michurinsk, 2002. – 186 s.

11. Besedina, E.N. Bunceovich L.L., Kostjuk M.A. Izuchenie jeffektivnosti novyh stimuljatorov rosta razlichnoj prirody pri klonal'nom mikrorazmnozhenii podvoev jabloni serii SK // Плодоводство и ягодоводство России. - 2014. - Т. XXXIX. - С. 29-32

12. Dosphehov, B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoi obra-botki rezul'tatov issledovanij) — 5-e izd., dop. i pererab.—M.: Agropromizdat, 1985. — 351 s.