

УДК 581.143.6

## **МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ НОВЫХ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ *VACCINIUM ULIGINOSUM* L.**

© 2010 г. А. А. Эрст, Н. А. Вечернина

*Алтайский государственный университет*  
(Барнаул, Россия)

Изучены процессы размножения четырех сортов голубики *Vaccinium uliginosum* L. в культуре *in vitro* пазушных почек. Культивирование эксплантов осуществлялось на питательной среде Андерсона. Установлено, что на этапе собственно размножения пазушные почки первые две недели следует культивировать на среде с 20 мкМ изопентиладенина (ИПА), а затем перенести их на среду с 5 мкМ ИПА. На этапе укоренения целесообразно использовать экспланты с укорененных регенерантов, что обеспечивает максимальный процент укоренения. Лучшим индуктором ризогенеза для сортов Шегарская, Дивная и Юрковская оказалась β-индолилуксусная кислота (ИУК), для сорта Иксинская – 3-индолилпропионовая кислота (ИПК). Растения-регенеранты успешно адаптированы на гидропонной установке «Минивит 0,35».

**Ключевые слова:** *Vaccinium uliginosum* L., размножение *in vitro*, пазушные почки, адвентивные почки, адаптация к условиям *ex vitro*, гидропоника

Вопрос рационального использования ягодных ресурсов включает не только их эксплуатацию, но и повсеместное возобновление. Промышленные заготовки ягод дикорастущей голубики *Vaccinium uliginosum* L. из-за разбросанности и труднодоступности их зарослей в настоящее время вообще не производятся (Яковлев, 1998). Ягоды этого вида характеризуются значительным разнообразием биологически активных веществ. Среди витаминов, содержащихся в них, большую долю занимают Р-активные вещества и витамин С (его содержание в 5 раз выше, чем в ягодах черники *V. myrtillus* L.), богаты ягоды голубики и пектиновыми веществами (Сенчук, 1973).

В Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН (г. Новосибирск) отобраны перспективные формы и выведены новые сорта голубики топяной.

Голубики традиционно размножают классическими методами вегетативного размножения, т.е. зелеными и одревесневшими черенками, а также отводками. Однако успешному применению этих методов препятствуют неко-

торые ограничения. Так, например, размножение черенками – относительно простой метод, но укоренение не всегда бывает удовлетворительным и часто требует применения регуляторов роста. Для укоренения черенков голубики топяной потребовалось применение регуляторов роста (3-индолилмасляной кислоты (ИМК) или β-индолилуксусной кислоты (ИУК)). 100%-ное укоренение этой культуры установлено только при размножении отводками без применения регуляторов роста (Снакина, 2007), но этот метод размножения трудоемок и требует значительной площади (Busby et al., 1999).

Применение альтернативного метода вегетативного размножения, такого как размножение *in vitro*, более оправдано и оказывается экономически выгодным, особенно при размножении перспективных форм и сортов плодовых и ягодных культур при дефиците исходного материала. Кроме того, этот метод позволяет ускоренно размножить новые перспективные культуры, получать здоровый растительный материал, работать в лаборатории круглый год и планировать выпуск посадочного материала к определенному сроку.

Применение культуры ткани для размножения *in vitro* различных представителей рода *Vaccinium* описано в ряде работ (Shibli et al.,

---

Адрес для корреспонденции: Эрст Анна Алексеевна, Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, г. Барнаул, Алтайский край, 656049, Россия; e-mail: annaerst@yandex.ru

1997; Fang et al., 1998; Александрова и др., 1999; Jaakola, 2001; Xiaoling et al., 2003; Clapa et al., 2006; Брилкина и др., 2008; Tetsumura et al., 2008). Целью данного исследования явилось изучение особенностей микроразмножения четырех сортов *Vaccinium uliginosum*.

## **МЕТОДИКА**

Материалом для разработки метода микроразмножения послужили растения голубики топяной *Vaccinium uliginosum* L. сортов Иксинская, Шегарская, Юрковская и Дивная.

В качестве исходного растительного материала использовали побеги с почками, взятые с растений весной, в начале набухания. Почки в течение 30 мин стерилизовали в 0,2% растворе сулемы, промывали в стерильной дистиллированной воде. С использованием стереомикроскопа из них вычленили меристемы размером 0,5 мм, которые культивировали на агаризованной питательной среде (рН 5,5) по прописи Андерсона, дополненные в 0-пассаже 5 мкМ изопентиладенина (ИПА).

На этапе собственно размножения изучено влияние различных концентраций ИПА (1-20 мкМ) на рост и развитие пазушных почек. Для укоренения использовали питательную среду Андерсона, дополненную одним из ауксинов: индолмасляная кислота (ИМК) (5, 10, 15 мкМ), 3-индолпропионовая кислота (ИПК) (5, 10, 15 мкМ), ИУК (2-15 мкМ), НУК (2 и 5 мкМ). Адаптацию растений-регенерантов проводили на гидропонной установке «Минивит 0,35», заполненной питательным раствором минеральных солей по прописи ½ среды Андерсона. Продолжительность пассажа составляла 30-35 сут.

Учитывались следующие показатели: коэффициент размножения как количество развившихся побегов у одного экспланта (шт./экспл.), длина побега (мм), количество пазушных почек, развившихся на побеге (шт.), частота укоренения (%), количество корней у одного регенеранта (шт.), средняя длина корней (мм).

Экспланты культивировали при температуре 24±1°C, фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота), освещенности 23 клк.

Статистическая обработка результатов проводилась путем расчетов с использованием пакета статистического анализа приложения Microsoft Excel. В таблицах показаны средние арифметические величины и доверительный

интервал. Достоверность оцениваемых показателей принимали на уровне значимости  $P < 0.05$  (Лакин, 1990).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

При введении эксплантов *in vitro* указанный режим поверхностной стерилизации пазушных почек оказался приемлемым и эффективным. Кроющие чешуи почек явились надежной защитой меристем от токсичного действия сулемы, выход неинфицированных жизнеспособных эксплантов составил 100%. На среде с 5 мкМ ИПА все меристемы к концу пассажа сформировали 2-5 побегов длиной 10-15 мм.

При изучении влияния ИПА на рост и развитие голубики топяной было показано, что коэффициент размножения зависел как от регенерации адвентивных побегов, так и от пазушного побегообразования. В наших исследованиях показано, что первостепенное влияние на количество дополнительных побегов имели генетические особенности сортов (рис. 1). Так, самый высокий коэффициент размножения (22 шт./эксплант) наблюдали у сорта Иксинская за счет закладки большого числа адвентивных побегов, а также развития пазушных побегов. Для сортов Шегарская, Юрковская, Дивная использование ИПА в концентрации 1-10 мкМ приводило к росту лидирующего побега и регенерации различного количества адвентивных побегов (2-7 шт.). Использование более высоких концентраций ИПА способствовало развитию большого количества адвентивных побегов, но было нецелесообразным из-за эффекта гипергидратации.

Для отборной формы №3 голубики топяной успешным оказался вариант использования двустадийного этапа собственно размножения – выращивание пазушных почек в течение двух недель на среде с высокой концентрацией ИПА, а затем на среде с пониженной концентрацией цитокининов. Такой прием позволил преодолеть эффект гипергидратации и сохранить высокий коэффициент размножения (Вечернина и др., 2008). Для исследуемых сортов этот прием также оказался эффективным: увеличилась длина побега, количество почек на побеге, а также коэффициент размножения (рис. 2).

Укоренение полученных побегов проводили на среде Андерсона, дополненной ауксинами ИМК или ИПК в концентрации 10 и 15 мкМ. Ризогенез на данных средах происходил

## МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ

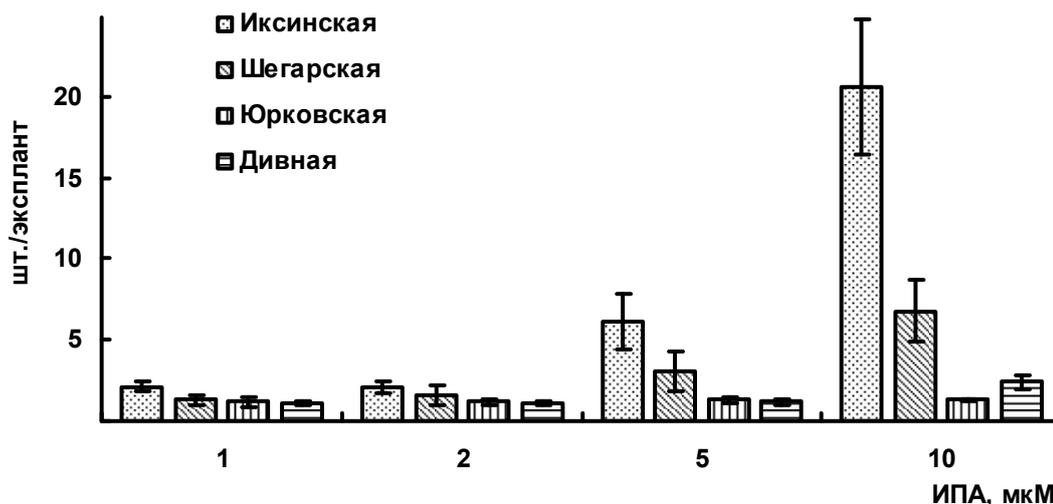


Рис. 1. Влияние ИПА на коэффициент размножения (шт./эксплант) сортов *Vaccinium uliginosum* в культуре пазушных почек *in vitro*.

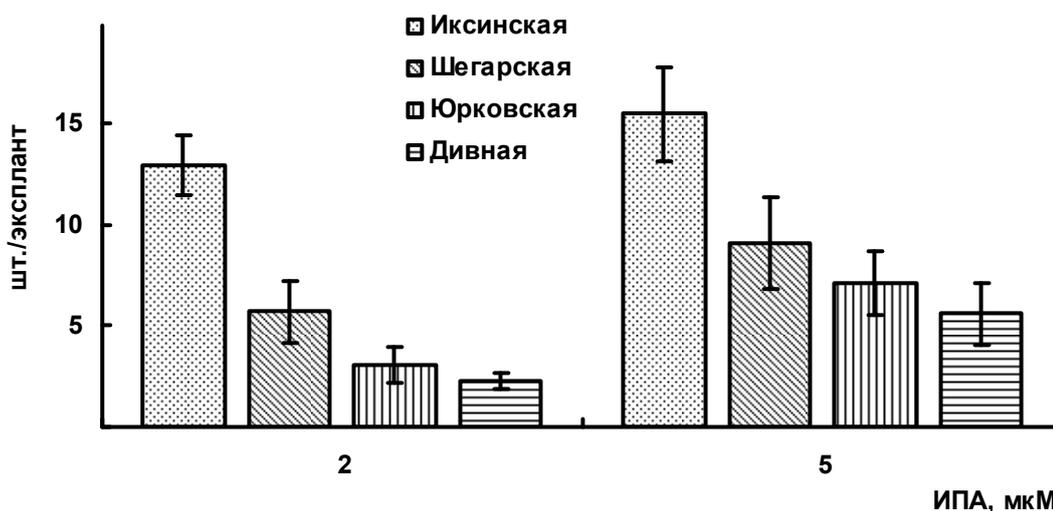


Рис. 2. Влияние ИПА на коэффициент размножения (шт./эксплант) *Vaccinium uliginosum* в культуре пазушных почек *in vitro* на среде Андерсона + ИПА 20 мкМ.

спонтанно через 2,5 месяца с частотой 70-80% для сортов Шегарская, Юрковская, Дивная и 10-20% для сорта Иксинская. В дальнейших исследованиях были использованы микропобеги с уже укорененных *in vitro* регенерантов голубики топяной. Такой прием обеспечил высокий процент укоренения, например, для стевии (*Stevia rebaudiana*) (Вечернина и др., 1996). Фрагменты побега с парой пазушных почек помещали на питательную среду для стимуляции ризогенеза, а затем вновь развившиеся побеги делили на микрочеренки для рекультивирования. Так, при культивировании эксплантов голубики топяной с укорененных регенерантов на среде с 10 мкМ ИМК у сорта Дивная первые

корни появились уже через 10 дней. Такой прием позволил получить 40-78% укорененных регенерантов трех сортов через один месяц культивирования (табл. 1).

Для изучения влияния ауксинов на процесс ризогенеза и характеристики регенерантов были использованы: ИМК (5, 10, 15 мкМ), ИПК (5, 10, 15 мкМ), ИУК (2-15 мкМ) и НУК (2 и 5 мкМ).

Общей закономерностью оказалось то, что использование ИУК, ИМК в относительно больших концентрациях (15 мкМ) стимулировало развитие каллуса на базальной части побегов и не приводило к развитию корней.

## ЭРСТ, ВЕЧЕРНИНА

**Таблица 1. Характеристики регенерантов *Vaccinium uliginosum*, укорененных на среде Андерсона + ИМК 10 мкМ через месяц культивирования (n=20)**

Сорт	Укоренение, %	Количество корней, шт./эксплант	Длина корней, мм
Иксинская	40	2-3	3-4
Юрковская	78	3-7	5-7
Дивная	64	5-10	4-6

**Таблица 2. Влияние ИУК на рост и развитие регенерантов *Vaccinium uliginosum* сорта Дивная при максимальном проценте укоренения**

ИУК, мкМ	n	Количество корней, шт./эксплант	Средняя длина корней, мм	Длина побега, мм	Количество почек, шт./эксплант
2	16	5,6±0,8	6,8±1,1	39,6±5,1	11,2±1,3
3	14	5,7±1,0	4,2±0,5	37,5±3,9	12,3±0,7
10	10	4,0±0,8	6,3±2,0	17,3±4,9	7,1±1,3

**Таблица 3. Влияние ауксинов на рост и развитие регенерантов *Vaccinium uliginosum* сорта Иксинская при максимальном проценте укоренения**

Ауксин, мкМ	n	Количество корней, шт./эксплант	Средняя длина корней, мм	Длина побега, мм	Количество почек, шт./эксплант
ИПК 10	22	2,8±0,6	7,8±2,3	28,1±5,3	11,4±1,1
ИМК 15	15	2-3	2-3	14,3±3,2	6,8±0,7
ИУК 4	15	1,1±0,2	1,2±0,4	23,4±2,9	8,6±1,2
НУК 2	13	1-2	8,1±3,5	15,4±2,4	6,5±0,6

Исходя из анализа роста и развития регенерантов голубики топяной, можно заключить, что лучшим индуктором ризогенеза (100% укоренение) для сортов Шегарская и Дивная является ИУК в концентрации 3 мкМ, для сорта Юрковская – 10 мкМ (рис. 3). Сорт Дивная укоренялся на 100% при низких (2 и 3 мкМ) и высоких (10 мкМ) концентрациях ИУК, но при этом отмечалась тенденция к уменьшению количества корней, длины побега и количества почек на побегах при увеличении концентрации ауксина в среде (табл. 2), поэтому оптимальной концентрацией для этого сорта является ИУК 2-3 мкМ. Сорт Шегарская проявил тенденцию к уменьшению корнеобразования при увеличении концентрации ИУК в среде, максимальный процент укоренения наблюдали при 3-4 мкМ через 1,5-2 месяца культивирования.

Голубика сорта Иксинская отличается от других изучаемых нами сортов высоким коэффициентом размножения и возможностью более длительного периода культивирования. Это

свидетельствует о высоком эндогенном содержании цитокининов, что часто препятствует процессу ризогенеза. Максимальный процент укоренения (77%) был получен нами через 1,5 месяца культивирования на среде, дополненной 10-15 мкМ ИПК (рис. 4). Растения-регенеранты, полученные на данной среде, отличались лучшими показателями роста и развития. У них более развитая корневая система, на побегах формировалось большее количество листьев большего размера (табл. 3, рис. 5).

Для *Vaccinium corymbosum* показана эффективность использования двустадийного этапа укоренения на среде, дополненной ИМК: побеги 14 дней культивировали в темноте, а затем при обычном фотопериоде. У *Rubus geoides* образование корней также инициировали семидневным выдерживанием растений в темноте (Vater et al., 2005). Нами был использован аналогичный прием (14 дней темнота, далее обычный фотопериод), но он оказался неэффективным для всех исследуемых сортов. У эксплан-

## МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ

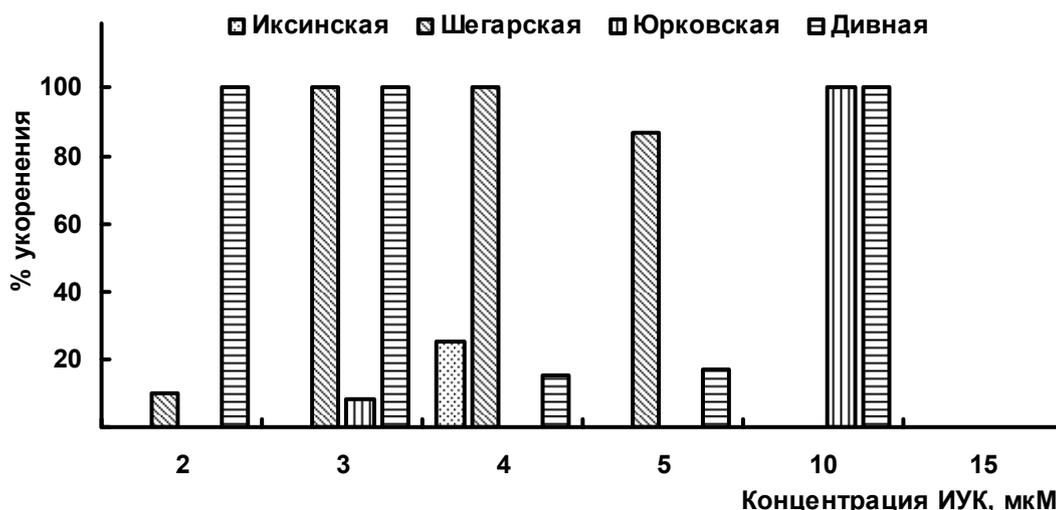


Рис. 3. Влияние концентрации ИУК на укоренение *Vaccinium uliginosum*.

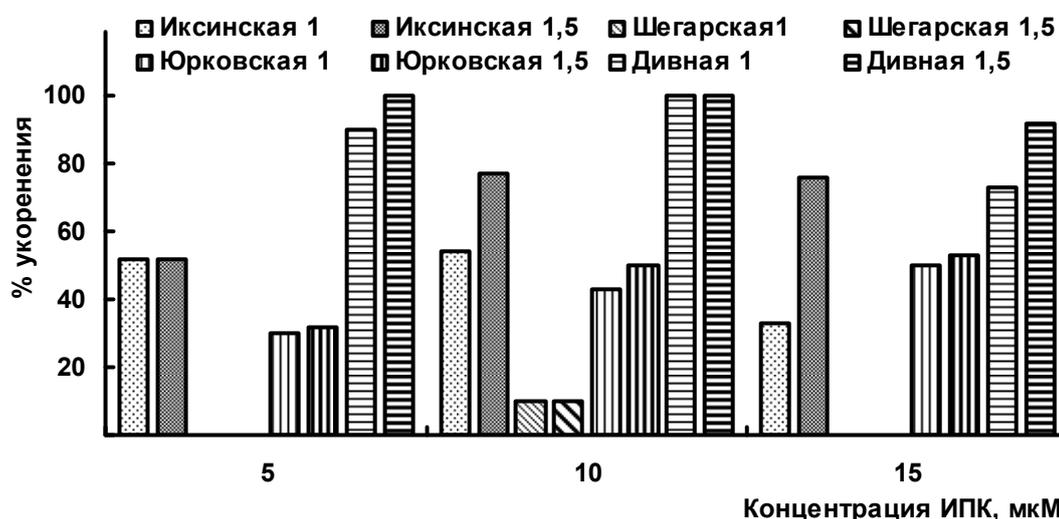


Рис. 4. Влияние концентрации ИПК и периода культивирования на укоренение *Vaccinium uliginosum*.

Примечание: 1 – 1 месяц; 1,5 – 1,5 месяца.

тов угнетались показатели роста и развития, не наблюдали процессов ризогенеза.

Завершающим этапом микроразмножения растений является адаптация к условиям *ex vitro*. Большинство растений адаптируют в теплицах, где нет проблем с созданием для растений повышенной влажности; понизить влажность возможно, но она всегда будет выше, чем в условиях открытого грунта. Поэтому растения из теплиц подвергаются стрессовому воздействию при высадке в открытый грунт. Существует опасность загнивания растений при адаптации в теплице и выход растений даже в случае применения фунгицидов невысок.

Альтернативный подход к адаптации регенерантов связан с использованием гидропонных установок «Минивит», разработанных для выращивания зеленых овощных культур.

Для адаптации растений-регенерантов голубики топяной использовали гидропонную установку: растения закрепляли в кассеты и помещали в вегетационную кювету, заполненную питательным раствором (30 л) по прописи ½ среды Андерсона (рис. 6, 7). Продолжительность адаптации составила 4-5 недель. На одной установке «Минивит 0.35» (0,35 м<sup>2</sup>) можно одновременно адаптировать к условиям выращивания *ex vitro* до 1000 растений-регенерантов голубики. Выход адаптированных

### ЭРСТ, ВЕЧЕРНИНА

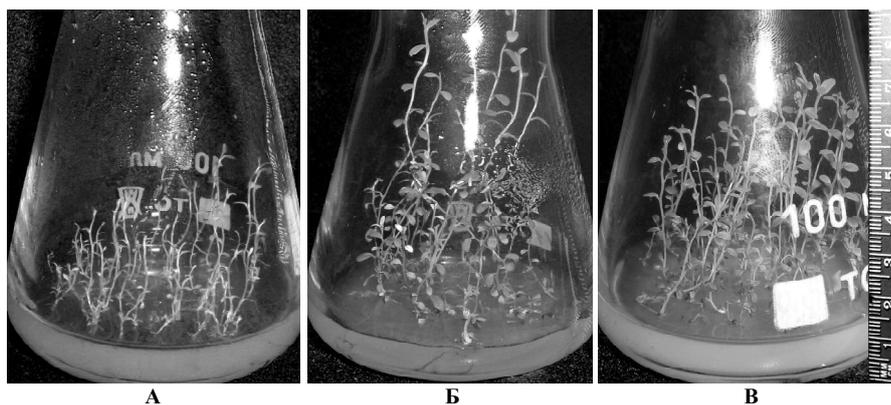


Рис. 5. Влияние различных ауксинов на показатели роста и развития регенерантов *Vaccinium uliginosum* сорта Иксинская.

А – ИМК 10 мкМ; Б – НУК 2 мкМ; В – ИПК 10 мкМ.

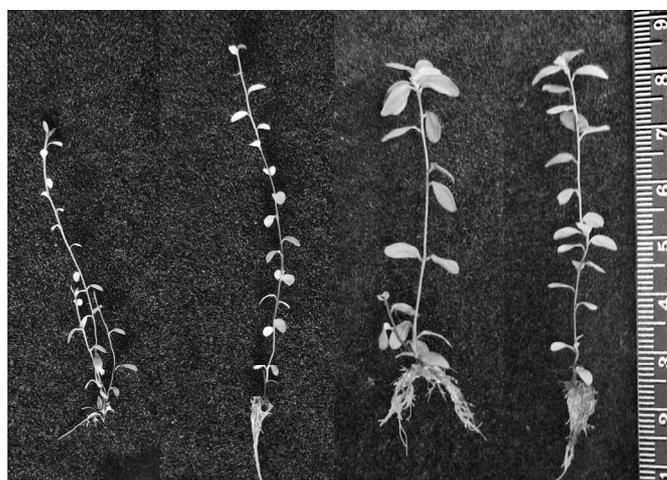


Рис. 6. Растения-регенеранты *Vaccinium uliginosum* перед периодом адаптации (сорта слева направо: Иксинская; Шегарская; Дивная; Юрковская).



Рис. 7. Растения-регенеранты *Vaccinium uliginosum* в конце периода адаптации на гидропонной установке «Минивит 0,35».

## МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ

к условиям выращивания *ex vitro* растений голубики составил 100%. В целом, хорошо развитая за период адаптации корневая система и надземная часть растений обеспечила им высокую приживаемость в условиях открытого грунта.

Таким образом, в результате наших исследований показана возможность ускоренного размножения *in vitro* четырех сортов *Vaccinium uliginosum*. Для получения высокого коэффициента размножения необходимо использовать двустадийную систему размножения: первые две недели культивировать на среде с 20 мкМ ИПА, а затем переносить их на среду с 5 мкМ ИПА. На стадии укоренения более эффективным оказалось использование микропобегов с укорененных регенерантов. Лучшим индуктором ризогенеза (100% укоренение) для сортов Шегарская и Дивная является ИУК в концентрации 3 мкМ, для сорта Юрковская – 10 мкМ, для сорта Иксинская ИПК 10 мкМ. Все растения-регенеранты успешно проходят период адаптации на гидропонной установке. Размножение *in vitro* голубики топяной может быть применено для ее ускоренного размножения и промышленного производства посадочного материала.

## ЛИТЕРАТУРА

- Александрова М.С., Стахеева Т.С., Васильева О.Г. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов голубики щитковой (*Vaccinium corymbosum* L.) // Проблемы дендрологии на рубеже XXI века. Тез. докл. Междунар. конф. – М., 1999. – С. 7-8.
- Брилкина А.А., Павлова Е.Е. Особенности микроклонального размножения представителей подсемейства брусничные // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. IX междунар. конф. – М., 2008. – С. 52-53.
- Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К. Культура *in vitro* *Stevia rebaudiana* Bert. // Флора и растительность Алтая. – Барнаул: Изд-во Алтай. ун-та, 1996. – С. 140-142.
- Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К. Микроразмножение *Stevia rebaudiana* Bert. // Современные тенденции развития промышленного садоводства. Мат-лы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 75-летию образования НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко. – Барнаул, 2008. – С. 349-354.
- Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Эрст А.А., Горбунов А.Б. Ускоренное размножение голубики топяной *in vitro* // Вестн. Алтай. гос. аграрн. ун-та. – 2008. – №6 (44). – С. 21-25.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М., 1990. – 352 с.
- Сенчук Г.В. Голубика – это не только витамины // Сел. хоз-во Белоруссии. – 1973. – № 1. – С. 29.
- Снакина Т.И. Интродукция голубики топяной (*Vaccinium uliginosum* L.) в Западной Сибири: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2007. – 16 с.
- Яковлев А.П., Ходасевич Л.В. Опытное выращивание *Vaccinium uliginosum* L. на выработанных торфяниках севера Белоруссии // Раст. ресурсы. – 1998. – Т. 34, вып. 2. – С. 23-29.
- Busby A.L., Himelrick D.V. Propagation of blackberries (*Rubus* spp.) by stem cuttings using various IBA formulation // Acta Hort. – 1999. – V. 505. – P. 327-332.
- Cao X., Fordham I., Douglass L., Hammerschlag F. Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated highbush blueberry shoots // Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. – 2003. – V. 75. – P. 255-259.
- Clapa D., Al F. The use of zeatin as growth regulator for the micropropagation of some highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) cultivars // Bul. Univ. Esti. Agr. Esi Med. Vet. Cluj-Napoca. Ser. Hort. – 2006. – V. 63. – P. 400.
- Fang Y., Smith M.A.L., Pepin M.F. Benzyl adenine restores anthocyanin pigmentation in suspension cultures of wild *Vaccinium pahalae* // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1998. – V. 54. – P. 113-122.
- Jaakola L. Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bilberry and lingonberry microshoots // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2001. – V. 66. – P. 73-77.
- Shibli R.A., Smith M.A.L., Kushad M. Headspace ethylene accumulation effects on secondary metabolite production in *Vaccinium pahalae* cell culture // Plant Growth Regul. – 1997. – V. 23. – P. 201-205.
- Tetsumura T., Matsumoto Y., Sato M. et al. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry // Sci. Hortic. – 2008. – V. 119. – P. 72-74.
- Vater G., Arena M. *In vitro* propagation of *Rubus geoides* // N. Z. J. Crop Hort. Sci. – 2005. – V. 33. – P. 277-281.

Поступила в редакцию  
25.02.2010 г.

**ЭРСТ, ВЕЧЕРНИНА**

**MICROPROPAGATION OF THE NEW PERSPECTIVE  
VACCINIUM ULIGINOSUM L. CULTIVARS**

A. O. Erst, N. A. Vechernina

*Altay State University  
(Barnaul, Russia)*

The way of micropropagation *in vitro* the 4 cultivars of blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) are described. *In vitro* cultivation of explants was on nutrient medium of A. It is established, that at a stage of micropropagation lateral buds were grown on the medium supplemented with  $2 \cdot 10^{-5}$  M of 2iP for two weeks, and then they were transferred to the medium of decreased cytokinin concentration ( $5 \cdot 10^{-6}$  M). At a stage of rooting IAA for the cultivars Shegarskaya, Urkovskaya and Divnaya, IPA – Ixinskaya were more effective as inductor of risogenes. All regenerates successfully adapt for *ex vitro* conditions by used hydroponic «Minivit 0,35».

**Key words:** *Vaccinium uliginosum* L., propagation *in vitro*, lateral buds, adventitious buds, adaptation for *ex vitro* conditions, hydroponic

**МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ НОВИХ ПЕРСПЕКТИВНИХ СОРТІВ  
VACCINIUM ULIGINOSUM L.**

A. O. Erst, N. A. Vechernina

*Алтайський державний університет  
(Барнаул, Росія)*

Вивчені процеси розмноження чотирьох сортів лохини *Vaccinium uliginosum* L. у культурі *in vitro* пазушних бруньок. Культивування експлантів здійснювалося на поживному середовищі Андерсона. Встановлено, що на етапі власне розмноження пазушні бруньки перші два тижні слід культивувати на середовищі з 20 мкМ ізопентиладеніну (ІПА), а потім перенести їх на середовище з 5 мкМ ІПА. На етапі укорінення доцільно використовувати експланти з укоріненних регенерантів, що забезпечує максимальний відсоток укорінення. Кращим індуктором ризогенезу для сортів Шегарська, Дивна і Юрковська виявилася β-індолілоцтова кислота, для сорту Іксинська – 3-індолілпропіонова кислота. Рослини-регенеранти успішно адаптовані на гідропонній установці «Мінівіт 0,35».

**Ключові слова:** *Vaccinium uliginosum* L., розмноження *in vitro*, пазушні бруньки, адвентивні бруньки, адаптація до умов *ex vitro*, гідропоніка