

УДК 632.38:634.2

## МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ МАЛИНИ (*RUBUS IDAEUS L.*)

**Т.В. МЕДВЕДЄВА**, кандидат біологічних наук

**Н.В.ТРЯПЩИНА, Т.А. НАТАЛЬЧУК**, кандидати с.-г. наук

**Я.С. ЗАПОЛЬСЬКИЙ**, аспірант

Інститут садівництва (ІС) НААН України, Київ-27, вул. Садова 23, e-mail: medvedevatv@ukr.net

*Досліджено індивідуальні особливості отримання асептичної культури трьох сортів малини. Підібрано живильні середовища для проліферації та вкорінення експлантів в культурі in vitro та способи їх адаптації до умов ex vitro. Доведено, що ефективність культивування мікропагонів малини обумовлена генетичними особливостями сорту.*

**Ключові слова:** *Rubus idaeus L.*, малина, in vitro, ex vitro, експланти, мікропагони.

**Вступ.** Малина (*Rubus idaeus L.*) є однією з найбільш важливих кущових ягідних культур в Україні – її насадження складають понад 5 тис. га. Ягоди споживають як у сирому, так і в переробленому вигляді, і з огляду на їх лікувальні властивості, завдяки високому вмісту антиоксидантів [1], інтерес до цієї культури зростає.

Традиційно переважну більшість генотипів малини розмножують живцюванням, відсадками чи кореневими пагонами. Але успішне розмноження багато в чому залежить від сприятливих погодних умов і потребує значних площ. До того ж чимало високопродуктивних генотипів важко або повільно вкорінюються при традиційних способах виконання цього процесу. І коли виникає необхідність швидко і у великих кількостях розмножити нові сорти чи гібриди для оцінки їх генетичних та економічних властивостей чи для задоволення потреб у садивному матеріалі, загальноприйняті способи виявляються досить повільними у здійсненні і тому ненадійними.

Віруси, нематоди і збудники грибних і бактеріальних захворювань також є серйозною загрозою при розмноженні малини традиційними методами, значно знижуючи кількість і якість урожаю. Перевірка фітовірусологічного стану маточних насаджень цієї культури свідчить про істотне поширення в них неповірусів (67,4%), серед яких найбільше – віруса кільцевої плямистості малини (ВКПМ) – 59,25%, а віруси латентної кільцевої плямистості суниці (ВЛКПС) та чорної кільчастості томатів (ВЧКТ) зустрічаються майже з однаковою частотою – 33,3 і 31,1% відповідно. Було зафіксовано також поодинокі випадки інфікування вірусом мозаїки резухи, загальний рівень розповсюдження якого склав 0,7%. Але найбільш поширений вірус кущистої

карликовості малини (ВККМ) – єдиний представник групи ідеовірусів (78,5%, а для деяких сортів – 100%) [2].

Для багатьох сортів малини виділення безвірусних клонів і виробництво безвірусного садивного матеріалу є досить проблематичним, а від того й актуальним [3].

Успіхи в біотехнології рослин дають можливість для швидкого вирощування високоякісного безвірусного та генетично однорідного рослинного матеріалу. Культура *in vitro* та мікроклональне розмноження рослин, що є обов'язковими етапами у схемі виробництва здорового садивного матеріалу (ОЕПР/ЕРРО, 1998, РМ 4/10), є цінною альтернативою при розмноженні плодових і ягідних культур, фітовірусологічному контролю та збереженні генетичних ресурсів і дає можливість отримувати у великих кількостях здорові саджанці в короткий термін на невеликих площах і незалежно від погодних умов. Технології вирощування оздоровленого садивного матеріалу багатьох видів культурних рослин базуються на основі комплексного застосування методів відбору безвірусних рослин, культури апікальних меристем, термо- та хемотерапії [4].

Здатність до утворення адвентивних пагонів у малини варіює в залежності від генотипу, тому при розробці умов культивування виникає необхідність оптимізації живильних середовищ для кожного сорту, що й було метою даного дослідження [5].

**Матеріали та методи.** Індивідуальні особливості отримання асептичної культури та мікроклонування вивчали на сортах малини Саня, Персея селекції Інституту садівництва НААН (Лушпіган О.П.) і Феномен (Краснокутський НДЦ, Бородіна О.В.).

Маточні рослини відбирали в колекційних насадженнях першої з названих установ за відповідністю помологічним ознакам сорту, обробляли відповідними пестицидами для звільнення від сапрофітної мікрофлори та утримували в контрольованих умовах перед вилученням експлантів для введення в культуру *in vitro*. Як експланти при ініціюванні асептичної культури використовували етіольовані кореневі пагони та зелені бруньки довжиною 1,0-1,5 см: перші вилучали з маточних рослин, починаючи з лютого по березень, останні – в першій декаді березня. Частину матеріалу утримували в холодильнику (температура +4°C, темрява) протягом двох місяців, і експланти з них (етіольовані пагони) вилучали в січні-лютому.

0,1%-й розчин хлориду ртуті ( $\text{HgCl}_2$ ) застосовували як стерилізуючий агент. Додатково використовували 70%-й етанол і комерційний розчин «Білизна» у п'ятикратному розведенні. Вивчали вплив тривалості експозиції стерилізації: обробку етанолом проводили протягом 30-60 сек. розчином хлориду ртуті – 3-5 хв. На етапі введення в культуру та проліферації застосовували середовище Мурасіге-Скуга (MS), що містило 6-БАП у концентрації 0,5-1,5 мг/л. Стерилізацію середовищ виконували за допомогою автоклавування при температурі 120°C і тиску 1 атм на протязі 20 хвилин.

Експланти культивували за 16-годинного світлового дня з інтенсивністю освітлення 2000 -2500 лк, температурою 20-22<sup>0</sup>С і вологістю повітря 50-60%.

Інфіковані та некротизовані експланти відбракували, а життєздатні пересаджували на живильне середовище для розмноження. Чергові пересадки проводили через 30-40 діб.

**Результати досліджень та обговорення.** Отримання стерильної культури є першим і дуже важливим етапом при мікроклональному розмноженні, особливо для ягідних культур. Адже їх тривале вегетативне розмноження, як правило, призводить до масового зараження насаджень патогенною мікрофлорою та вірусними інфекціями, що гальмує розвиток експланта на живильному середовищі. Ефективність введення в культуру *in vitro* та подальшої регенерації значною мірою залежить від типу експланта, правильності вибору стерилізуючого агента, експозиції стерилізації, компонентів і співвідношення фітогормонів у середовищі для культивування. Ми випробовували три варіанти стерилізації 0,1%-ним розчином хлориду ртуті ( HgCl<sub>2</sub>) – 3, 4 і 5 хвилин з додатковою обробкою експлантів 70%-ним етиловим спиртом (табл. 1). Перед безпосередньою стерилізацією експланти протягом 20-ти хв. обробляли розчином «Білизна» у п'ятикратному розведенні.

#### 1. Вплив режиму стерилізації і типу експланта на ефективність введення рослин малини в культуру *in vitro*

Варіант стерилізації	Вихід стерильних експлантів, %					
	Саня		Персея		Феномен	
	зелені бруньки	етіольов. пагони	зелені бруньки	етіольов. пагони	зелені бруньки	етіольов. пагони
EtOH 70% – 30 сек., 0,1% HgCl <sub>2</sub> – 3 хв.	66	73	75	86	70	77
EtOH 70% – 45 сек., 0,1% HgCl <sub>2</sub> – 4 хв.	61	70	71	79	67	71
EtOH 70% – 1 хв., 0,1% HgCl <sub>2</sub> – 5 хв.	59	68	65	71	62	66

Збільшення тривалості стерилізації спричинювало підвищення відсотка некрозів, тому оптимальним для всіх досліджуваних сортів виявився перший варіант, при якому вихід стерильних експлантів складає 73-86% залежно від сорту для етіюльованих корневих пагонів та 66-75% для зелених бруньок. Із двох типів експлантів, які вивчали, кращі результати були отримані при використанні етіюльованих корневих пагонів. Різниця в залежності від сорту становила 7-11%. В цілому ж для ініціювання асептичної культури малини можна рекомендувати обидва типи експлантів. Частину рослинного матеріалу перед введенням в культуру *in vitro* піддава-

ли охолодженню протягом 2-х місяців при температурі +4°C. Етіюльовані кореневі пагони з таких рослин стерилізували, застосовуючи перший варіант (ЕтОН 70% – 30 сек., 0,1% HgCl<sub>2</sub> – 3 хв.). Виявилося, що обробка вихідного матеріалу низькою температурою перед вилученням експлантів сприяла зниженню рівня контамінації на 13-18% (табл. 2).

## 2. Вплив обробки експлантів малини низькою температурою на ефективність введення в культуру *in vitro*

Сорт	Охолодження	Контамінація, %	Життєздатні експланти, %
Саня	Ні	27	73
	Так	13	87
Персея	Ні	14	86
	Так	1	99
Феномен	Ні	23	77
	Так	5	95

Процес регенерації з первинних експлантів малини часто супроводжується виділенням ними в живильне середовище фенольних сполук, що пригнічують регенераційні та ростові процеси і можуть призводити до некрозів. Щоб запобігти таким явищам, деякі автори рекомендують часті пересадки на свіже середовище, додавання до його складу активованого вугілля та фітагель замість агару [6]. В наших дослідженнях здорові експланти вдалось отримати, додаючи до складу середовища на перших етапах культивування аскорбінову кислоту в концентрації 55 мг/л (рис.1). На протязі першого місяця культивування на живильному середовищі Мурасіге-Скуга, що містило 0,5 мг/л БАП, з ізолюваних експлантів розвивалися мікропагони, які пересаджували на середовище для формування розеток.



Рис.1. Процес регенерації з первинного експланта (етіюльованого кореневого пагона) малини в культурі *in vitro*

При стимулюванні розвитку адвентивних пагонів у середовище додають цитокініни, що мають властивість знімати апікальне домінування. Для малини найчастіше використовують 6-бензиламінопурин, оскільки доведено, що кінетин і зеатин малоефективні щодо стимулювання утворення та елонгації пагонів. Натомість вони викликають утворення калусу [7]. В середовище для проліферації ми додавали БАП у концентрації 0,5; 1,0 і 1,5 мг/л відповідно по варіантах. Вміст індолілмасляної та гіберелової кислот залишався сталим у всіх варіантах. Визначали коефіцієнт пагоноутворення і довжину мікропагонів (табл.3).

### 3. Вплив концентрації БАП на проліферацію малини

Сорт	Вміст БАП, мг/л	Коефіцієнт пагоноутворення	Середня довжина пагонів, мм
Саня	0,5	2,4 ± 0,33**	21,3 ± 1,43**
	1,0	2,8 ± 0,61	24,5 ± 1,65**
	1,5	3,2 ± 0,19**	19,7 ± 1,11**
Персея	0,5	3,9 ± 0,21**	23,4 ± 1,18
	1,0	4,4 ± 0,54	26,7 ± 2,23**
	1,5	4,9 ± 0,22**	21,5 ± 2,15**
Феномен	0,5	4,1 ± 0,32**	24,3 ± 1,26
	1,0	4,8 ± 0,65	25,6 ± 1,37**
	1,5	5,3 ± 0,29**	22,1 ± 1,83**

\* - p<0,05; \*\* - p<0,01; \*\*\* - p<0,001

Перший із названих показників по всіх досліджуваних генотипах збільшувався при підвищенні концентрації БАП, зокрема, якщо вона становила 1,5 мг/л у порівнянні з 0,5 мг/л. Стосовно довжини мікропагонів її варіювання в цілому було незначне, але в усіх сортів вони були найдовшими на середовищі із 1,0 мг/л БАП. Водночас при 1,5 мг/л БАП зростала кількість вітрифікованих рослин, а самі вони були вкороченими і з голкоподібними листочками, на яких при дотиканні їх до поверхні середовища утворювався калус. Ці явища були відсутні, якщо останнє містило менше цитокініну. Таким чином, для культивування досліджуваних сортів малини можна рекомендувати живильні середовища з концентраціями БАП від 0,5 до 1,0 мг/л.

Як і при ініціюванні асептичної культури, у процесі вирощування чітко простежується вплив генотипових особливостей сорту на ефективність проліферації. У сорту Саня зафіксовано найменший коефіцієнт пагоноутворення (2,4 - 2,8), а для Феномена найбільший (4,1 - 4,8). Явища хлорозу, які відмічалися при культивуванні малини, зникали при додаванні подвійної концентрації хелату заліза або при використанні комплексної солі NaFeEDTA (40 мг/л) (рис. 2).

Укорінення мікропагонів стимулювали на середовищі, яке містило індуктор ризогенезу ІМК в концентрації 1,0 мг/л. Цей процес тривав 30 - 45 днів залежно від сорту. Кількість укорінених мікропагонів у Сані становила 74, Персеї – 87 і Феномена – 91% (рис. 3).



Рис. 2. Проліферація малини сорту Персея на модифікованому середовищі MS в культурі *in vitro*



Рис. 3. Мікропагін малини сорту Феномен, укорінений в культурі *in vitro*

Відмічено, що якщо перед пересадкою для вкорінення рослини культивували на середовищі з невисокою концентрацією БАП (0,5 мг/л), процент укорінених був вищим на всіх сортах, які вивчались. Отже, у процесі культивування малини пасажі з високими концентраціями цитокиніну можна чергувати з пасажимами з низькою, так щоб перед стадією вкорінення зняти вплив високих концентрацій БАП і, таким чином, підвищити вихід укорінених рослин. Збільшенню відсотка вкорінених мікропагонів сприяє також висадження їх на середовище для стимулювання ризогенезу не поодинокими рослинами, а невеликими кластерами.

Головною проблемою мікроклонального розмноження є адаптація мікропагонів до нестерильних умов. У рослин, вирощених *in vitro*, слабо розвинені провідна система ксилеми і продиговий апарат. Приживлюваність регенерантів у першу чергу залежить від здатності мікропа-

гонів витримувати низьку вологість. Оскільки листові пластинки позбавлені епікутикулярного воску, вони швидко зневоднюються при перенесенні з умов *in vitro* в *ex vitro* і гинуть [8]. У зв'язку з цим надзвичайне значення має вибір умов адаптації.

Вкорінені пагони, що досягли розміру 2 см і більше, адаптували до умов *ex vitro* з початку квітня в холодній теплиці на субстраті “Florabalt”, який змішували в рівних об'ємах з дерновою землею та перлітом. Для підтримання високого рівня вологості (до 90-100%) лотки з висадженими рослинами накривали поліетиленовою плівкою, яку поступово відкривали, починаючи з другого тижня адаптування. На його початку температуру в теплиці підтримували в межах 6-8<sup>0</sup> С. За таких умов вихід пристосованих рослин становив 91-98% залежно від сорту (рис. 4).



Рис. 4. Рослина-регенерант малини сорту Саня – базовий матеріал для маточних насаджень

**Висновки.** 1. Для отримання асептичної культури малини найбільш придатними експлантами є етіюльовані кореневі пагони та зелені бруньки.

2. Найвищий вихід стерильних експлантів забезпечує застосування 0,1%-го розчину хлориду ртуті протягом трьох хвилин з додатковою обробкою 70 %-ним спиртом (30 секунд) і розчином «Білизна» у п'ятикратному розведенні – 20 хвилин.

3. Додавання аскорбінової кислоти в концентрації 55 мг/л в середовище для ініціювання асептичної культури запобігає зафенолюванню та загибелі експлантів.

4. Обробка вихідного матеріалу при температурі +4°C протягом двох місяців перед вилученням експлантів сприяла зниженню рівня контамінації на 13-18%.

5. Для культивування досліджуваних сортів малини можна рекомендувати середовища з вмістом БАП від 0,5 до 1,0 мг/л і подвійною концентрацією хелату заліза.

6. Укорінення цих сортів відбувається на протязі 30-45 днів на середовищі, котре містить 1,0 мг/л ІМК, і рівень його складає 74-91% залежно від сорту.

7. Використання середовища з низькою концентрацією БАП для культивування мікропагонів перед стадією вкорінення сприяє збільшенню відсотка вкорінених рослин.

8. Ефективність введення в культуру *in vitro*, приживлюваності експлантів, регенерації, проліферації, вкорінення та адаптації мікропагонів була для кожного сорту специфічна і обумовлена його генетичними особливостями.

### **Список використаної літератури**

1. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cell in vitro /Seeram N.P., Adams L.S., Zhang Y. et al. // J Agric Food Chem.– 2006.– № 54.– P. 9329-9339.
2. Медведєва Т.В., Тряпичина Н.В., Супрун К.І. Оцінка фітовірусологічного стану та оздоровлення рослин роду *Rubus* // Тези VI Міжнар. конф. «Біоресурси та віруси».– Київ, 2010. – С.79, 226.
3. Wood G.A., Hall H.K. Source of Raspberry bushy dwarf virus in *Rubus* in New Zealand, and the infectibility of some newer cultivars to this virus //New Zealand J Crop Hort Sci .– 2001.– №29.– P. 177-186.
4. Spiegel S., Frison E.A., Converse R.H. Recent development in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal plant germ plasm // Plant Disease.– 1993.–V.77, №12.– P.1176-1180.
5. Cousineau J.C., Donnelly D.J. Adventitious shoot regeneration from leaf explant of tissue cultured and greenhouse-grown raspberry// Plant Cell, Tiss.Org. Cult. – 1991.– № 20.– P.249-255.
6. Minas G.J., Neocleus D. A protocol for rapid clonal micropropagation *in vitro* of primocane-frutting red raspberry cultivars// Miscellaneous reports. V. 95.–2007.– P. 2-7.
7. Wu J.-H., Miller S.A., Hall H.K., Mooney P.A. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*// Plant Cell, Tiss.Org. Cult. – 2009.– № 99.– P.17-25.
8. Медведєва Т.В. Проблеми акліматизації культивованих *in vitro* рослин // Фізіологія і біохімія культурних рослин. Т.40. – 2008.– № 4.– С. 299-309.

## **RASPBERRY (*RUBUS IDAEUS* L.) MICROCLONAL PROPAGATION**

**T.V. MEDVEDYEVA, N.V. TRYAPITSYNA, T.A. NATALCHUK, PhDs**

**Y.S. ZAPOL'S'KY, Post Graduate Assistant**

Institute of Horticulture, NAAS of Ukraine, Kyiv - 27, 23, Sadova st., e-mail: medvedevatv@ukr.net

*The authors have researched the peculiarities of acquiring the aseptic culture of three raspberry cultivars and proved that the efficiency of this crop microshoots cultivation depends on the cv genetic characteristics. The culture media have been selected for the explants proliferation and rooting in vitro and methods of their adaptation in the ex vitro conditions.*

**Key words:** *Rubus idaeus* L., raspberry, *in vitro*, *ex vitro*, explants, microshoots.



**МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ МАЛИНЫ (*RUBUS IDAEUS L.*)****Т.В. МЕДВЕДЕВА**, кандидат биологических наук**Н.В. ТРЯПИЦЫНА, Т.А. НАТАЛЬЧУК**, кандидаты с.-х. наук**Я.С. ЗАПОЛЬСКИЙ**, аспирант

Институт садоводства НААН Украины, Киев-27, ул. Садовая, 23, e-mail: medvedevatv@ukr.net

*Исследованы особенности получения асептической культуры трех сортов малины. Выбраны питательные среды для пролиферации и укоренения эксплантов в культуре in vitro и способы их адаптации к условиям ex vitro. Доказано, что эффективность культивирования микропобегов малины обусловлена генетическими особенностями сорта.*

**Ключевые слова:** *Rubus idaeus L.*, малина, in vitro, ex vitro, экспланты, микропобеги.

Одержано редколлегією 10.02.16