

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ РОСТА МАЛИНЫ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Л.В. Иванова-Ханина, кандидат сельскохозяйственных наук

Южный филиал Национального университета биоресурсов и природопользования Украины «Крымский агротехнологический университет»

Представлены результаты исследований эффективности получения асептической культуры ремонтантной малины в осенний период. Установлено, что наиболее эффективным при введении в культуру in vitro исследуемых сортов является добавление в питательную среду БАП (0,5 мг/л) и ГК (0,2 мг/л).

Ключевые слова: асептическая культура, контаминация, эксплант, культура in vitro, клональное микроразмножение.

Постановка проблемы. Плоды ягодных культур в Крыму пользуются повышенным спросом, особенно в курортный сезон. При этом в промышленных условиях культивируют в основном землянику, а такие ягодные культуры, как малина, ежевика, смородина и крыжовник возделываются преимущественно на приусадебных участках и в фермерских хозяйствах [1]. Такая ситуация обусловлена в первую очередь климатическими условиями региона – скудные осадки, жара и сухость воздуха, поздневесенние заморозки и непредсказуемая зима способствуют необходимости постоянного обновления ассортимента ягодных на приусадебном участке. В то же время, появление на рынке новых сортов, отличающихся высокой урожайностью, крупным размером и привлекательным внешним видом ягоды, имеющих бесшипные или слабошипованные побеги, не нуждающиеся в опоре или подвязке, вызывает интерес и, соответственно, рождает спрос на посадочный материал.

В связи с тем, что закладка питомников ягодных культур на территории Крыма ограничена погодно-климатическими условиями, актуальным стал вопрос возможности использования биотехнологических методов, в частности, клональ-

ного микроразмножения в культуре *in vitro*. Этот метод характеризуется высоким коэффициентом размножения (до 1:107), что позволяет ускорить внедрение новых высокопродуктивных сортов, пользующихся повышенным спросом, в производство [2].

Анализ последних исследований и публикаций. Благодаря исследованиям многих авторов [2-7] накоплен достаточно большой опыт культивирования *in vitro* ягодных культур, в том числе малины красной (*Rubus idaeus* L.). Однако в этих работах подчеркивается, что необходимо учитывать влияние генотипа на процессы морфогенеза в культуре *in vitro*, что обуславливает необходимость подбора и оптимизации состава питательных сред и условий культивирования в зависимости от видовой и сортовой специфичности эксплантов.

Цель наших исследований – выявить особенности морфогенеза малины в культуре изолированных почек *in vitro* и подобрать оптимальный гормональный состав питательной среды.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследований служили растения малины (*Rubus idaeus* L.) сортов Брусвяна, Joan J (Джоан Джи) и Примара.

При проведении экспериментальной работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных клеток, тканей и органов растений [8-9]. Поверхностную стерилизацию растительного материала осуществляли последовательной обработкой 70% этанолом (40 с) и препаратом Domestos в нескольких вариантах разведения и экспозиции, затем промывали в трех сменах автоклавированной дистиллированной воды. Культивирование почек осуществляли на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС), содержащей 0,7% агары и дополненной регуляторами роста группы ауксинов, цитокининов и гиббереллинов в различных соотношениях. Условия культивирования: температура 24-26 °С, относительная влажность воздуха 60-70%, фотопериод 16 ч, освещенность 2 тыс. люкс. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакет прикладных программ Excel 7.0 для Microsoft Windows®.

Результаты исследований. Анализ результатов влияния концентрации и длительности воздействия препарата Domestos на эффективность получения асептической культуры исследуемых сортов малины показал, что оптимальным было разведение 1:1 (табл. 1).

Таблица 1

Влияние концентрации и экспозиции препарата Domestos на эффективность освобождения эксплантов малины от контаминаций

Вариант	Процент свободных от контаминации растений по сортам			
	Экспозиция, мин.	Брусвяна	Joan J	Примара
Концентрация 1:9	11 (к)	10,2±4,0	0	0
	15	16,5±8,3	10,8±1,4	8,8±2,1
2:8	10	20,6±1,8	10,0±2,0	6,0±1,4
	15	33,3±1,8	33,3±5,3	28,4±7,6
1:1	8	64,6±6,5	55,0±4,8	53,2±8,6
	10	86,7±6,2	80,5±8,2	60,0±12,4

Выявлено, что уровень свободных от контаминации эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro* варьировал от 6,0 до 86,7%. Наиболее полное освобождение от сапрофитной микрофлоры было отмечено при использовании препарата Domestos в 50% концентрации. Анализ литературных источников за последние годы позволил выделить этот препарат, как наиболее доступный и дешевый для использования в качестве стерилизующего вещества, однако концентрации, рекомендованные авторами [3, 4], предусматривали разведение его на уровне 5-10% раствора. В нашем эксперименте, вероятнее всего, высокий уровень контаминации был обусловлен осенним сроком введения в изолированную культуру. Оптимальные результаты для эксплантов исследуемых сортов были получены при использовании 50% Domestos в экспозиции 10 мин. с предварительной обработкой этанолом в течение 40 секунд. Снижение концентрации стерилизующего агента, как и времени воздействия, способствовало повышению процента контаминаций. Увеличение же экспозиции приводило

к значительному снижению жизнеспособности эксплантов, поскольку длительное воздействие химически активных веществ оказывало губительное влияние на растительные ткани. Следует отметить, что указанный вариант поверхностной стерилизации был оптимальным для всех исследуемых сортов, в результате было получено 60-87% свободных от контаминаций эксплантов.

Первым этапом работ по клональному микроразмножению растений является введение эксплантов в культуру *in vitro* и индукция их интенсивного роста и развития путем создания оптимальных условий для культивирования. Успешность этого этапа, особенно для многолетних растений, во многом определяет срок изоляции экспланта. В данном эксперименте введение в культуру *in vitro* осуществляли в осенний период, поскольку мягкие погодные условия сентября и октября в Крыму способствовали успешному выделению жизнеспособных почек. Проведенными исследованиями было установлено, что для изучаемых сортов характерен достаточно высокий уровень приживаемости изолированных почек на искусственной питательной среде МС (рис.).

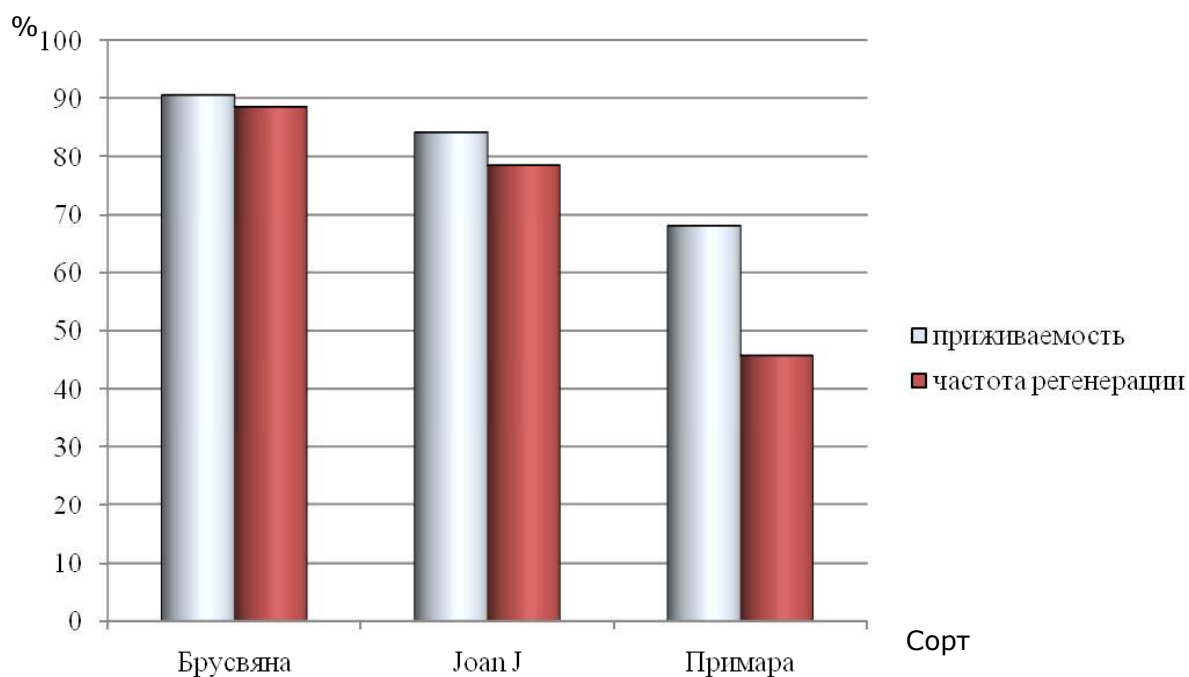


Рис. Уровень приживаемости и частота регенерации у исследуемых сортов малины в осенний срок введения в культуру *in vitro*

Следует отметить, что сорт Брусвяна отличался большей приживаемостью на этапе введения в культуру *in vitro* (90,5%). Несколько ниже были показатели приживаемости у сорта Joan J (84,2%). Частота регенерации варьировала по сортам от 45,8 до 88,5%. Наиболее высокие показатели были характерны для сорта Брусвяна (88,5%). Почки сорта малины Примара характеризовались невысокими показателями: приживаемость составила 68,0, а частота регенерации – 45,8%.

Исследованиями некоторых авторов [2, 5, 7] показано, что особую трудность при введении в культуру *in vitro* ягодных растений вызывает выделение ими в питательную среду фенольных веществ, приводящих к снижению регенерационных и ростовых процессов и в дальнейшем – к некрозу. В наших экспериментах потемнение питательной среды вокруг экспланта вследствие выделения фенольных соединений было отмечено уже через 1-1,5 часа после помещения их на питательную среду. Поэтому в соответствии с рекомендациями авторов [2, 5] мы добавляли в питательную среду аскорбиновую кислоту в концентрации 1 мг/л. В качестве гормональных добавок в среду использовали цитокинины (БАП), ауксины (ИМК) и гиббереллины (ГК) в различных концентрациях.

Следует отметить, что после введения в изолированную культуру почки на 5-7 день культивирования начинали раскрываться и образовывать первые листочки. В течение 30 суток культивирования экспланты формировали небольшой кустик с одним-тремя облиственными побегами различной длины.

Использование в качестве экспланта организованной структуры (почки) и добавление в питательную среду регуляторов роста группы цитокининов позволяло снять апикальное доминирование и вызвать образование побегов сразу из нескольких точек роста (табл. 2, 3).

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены особенности подготовки растительного материала

для отбора эксплантов и оптимизированы условия введения почек исследуемых сортов малины в культуру *in vitro*.

Таблица 2

Влияние гормонального состава питательной среды на рост микропобегов малины в культуре *in vitro* (30 сут. культивирования)

Параметры роста	Содержание и концентрация гормонов, мг/л				
	БАП 0,2 ГК 0,1	БАП 0,5 ГК 0,1	БАП 0,5 ГК 0,2	БАП 1,0 ГК 0,5	БАП 1,0 ИМК 0,5
Брусвяна					
Высота основного побега, мм	17,3±1,2	26,7±2,1	29,7±0,8	30,3±2,3	26,3±0,8
Количество побегов, шт.	2,2±0,2	1,8±0,2	2,4±0,1	2,0±0,2	2,4±0,1
Joan J					
Высота основного побега, мм	22,8±1,1	26,3±1,6	28,5±2,1	27,3±1,4	27,1±1,5
Количество побегов, шт.	1,2±0,6	1,0±0,25	1,2±0,6	2,3±0,4	1,6±0,2
Примара					
Высота основного побега, мм	13,6±1,2	15,2±0,9	15,8±1,3	16,4±0,7	13,4±0,8
Количество побегов, шт.	1,1±0,2	1,4±0,5	1,3±0,2	1,6±0,3	1,0±0,0

Анализ полученных нами биометрических данных показал, что при культивировании почек малины сорта Брусвяна формировалось и развивалось несколько побегов (1,8-2,4 шт.), тогда как у остальных исследуемых сортов формировался преимущественно один интенсивно развивающийся побег. Высота побегов варьировала в зависимости от используемых питательных сред. 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 (0,2 и 0,5 мг/л). При этом между этими вариантами не было существенных различий, увеличение концентрации БАП до 1,0 мг/л и ГК до 0,5 мг/л не оказало значительного эффекта. Подобная ситуация наблюдалась и у сорта Joan J – варианты питательной среды с добавлением БАП (0,5 и 1,0 мг/л) и ГК (0,1, 0,2 и 0,5 мг/л) не имели существенных различий по высоте формирующихся на них побегов. Однако, повышение концентрации БАП до 1,0

мг/л в сочетании с ГК (0,5 мг/л) способствовало образованию дополнительных побегов ($2,3 \pm 0,4$ шт.). Таким образом, указанная концентрация оказалась оптимальной для данного сорта. Сорт малины Примара характеризовался меньшей силой роста, более длительным развитием после введения его в культуру *in vitro*. Отмечено, что экспланты этого сорта формировали преимущественно один побег, высота которого за 30 суток культивирования составила 13,4-16,4 мм. Добавление в питательную среду ИМК на этапе введения у всех исследуемых сортов способствовало формированию нормально развивающихся побегов и появлению корней у единичных микропобегов, но частота ризогенеза не превышала таковую в других вариантах и была отмечена только в отдельных вариантах.

Выводы:

1. Установлено, что наиболее эффективным для введения в культуру *in vitro* изолированных почек малины в осенний срок является 50% концентрация препарата Domestos, что обеспечивает освобождение от контаминаций на уровне 60,0-86,7%.
2. Оптимальной модификацией питательной среды МС на этапе введения в культуру *in vitro* для большинства исследуемых сортов малины является добавление БАП (0,5 мг/л) и ГК (0,2 мг/л).

Список використаних джерел:

1. Копылов В. И. Плодоводство Крыма в XXI веке / В. И. Копылов, В. В. Шевченко, Н. М. Щербатко // Агропромышленный комплекс Крыма в XXI веке : научн. труды КГАУ. — Симферополь, 2002. — Вып. 68. — С. 68 — 77.
2. Соловых Н. В. Клональное размножение ягодных культур *in vitro* / Н. В. Соловых, С. А. Муратова, М. Б. Янковская // Актуальные проблемы размножения ягодных культур и пути их решения : матер. междунар. научн.-метод. дистанционной конф., 2010. — Режим доступа к журн. : <http://konferenc2010.narod.ru>.
3. Микрклональное размножение малины как метод сохранения биоразнообразия растений в Казахстане / И. Ю. Ковальчук, З. Р. Мухитдинова, Т. Т. Турдиев [и др.] // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира — 2008 : матер. II Всероссийской научн.-практич. конф. 19-21 авг. 2008 г. — Волгоград, 2008. — Режим доступа к журн. : <http://botanicblog.ru/public/biotech-2008/stat410>
4. Клональное размножение растений красной малины (*Rubusidaeus L.*) *in vitro* / Г. К. Оразбаева, И.Л. Майсупова, В.Т. Хасанов, В.К. Швидченко // Вестник науки КазАТУ им. С. Сейфуллина. — 2012. — №1 (72). — С.140 — 149.

5. Соловых Н. В. Использование биотехнологических методов в работе с ягодными культурами / Соловых Н. В. // Методические рекомендации. — Научноград РФ : ГНУ ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина, 2009. — 47 с.
6. Туровская Н.И. Микрклональное размножение малины / Н. И. Туровская, О.В. Стрыгина // Садоводство и виноградарство. — 1990. — № 8. — С. 26 — 29.
7. Таварткиладзе О. К. Размножение ежевики в культуре *in vitro* / О. К. Таварткиладзе, Н. А. Вечернина // Известия Алтайского государственного университета. Биологические науки. : электронный журнал. — № 3 (55). — Режим доступа к журн. : <http://izvestia.asu.ru/2007/3/biol/TheNewsOfASU-2007-3-biol-06.pdf>
8. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. — К. : Наукова думка, 1980. — 488 с.
9. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Бутенко Р. Г. — М. : Наука, 1964. — 272 с.

Л.В. Іванова-Ханіна. Вплив гормонального складу живильного середовища на інтенсивність росту малини в культурі in vitro.

*Представлено результати досліджень з ефективності отримання асептичної культури ремонтантної малини в осінній період. Встановлено, що найбільш ефективним при введенні в культуру *in vitro* досліджуваних сортів є добавлення в живильне середовище БАП (0,5 мг/л) та ГК (0,2 мг/л).*

L. Ivanova-Khanina. Influence of the nutrient medium hormonal composition on the growth intensity of raspberries in the *in vitro* culture.

*The research results of efficiency receiving remontant raspberries aseptic culture in autumn are presented. It is found that the most effective for the introduction *in vitro* culture the addition in nutrient medium BAP (0,5 mg/l) and GA (0,2 mg/l) for studied sorts of raspberries.*