

Теоретические и практические аспекты клонального микроразмножения ягодных культур

Theoretical and practical aspects of clonal propagation of small fruit cultures

Малаева Е. В.^{1,2}

Malaeva E. V.^{1,2}

¹ Волгоградский региональный ботанический сад, г. Волгоград, Россия. E-mail: e.malaeva@mail.ru

² Волгоградский государственный социально-педагогический университет, г. Волгоград, Россия

¹ Volgograd Regional Botanical Garden, Volgograd, Russia

² Volgograd State Social and Pedagogical University, Volgograd, Russia

Реферат. Генетический банк плодово-ягодных культур Волгоградского регионального ботанического сада насчитывает более 150 видов, сортов и отборных форм, представленных следующими семействами: Grossulariaceae (*Grossularia* Mill., *Ribes* L.), Caprifoliaceae (*Viburnum* L., *Lonicera* L. (honeysuckle)), Rosaceae (*Rubus* L. (primocane raspberry), *Fragaria* L.), Actinidiaceae (род *Actinidia* Lindl.), Ericaceae (*Vaccinium* L.). В результате исследований проведена оптимизация условий культивирования ягодных культур на разных этапах клонального микроразмножения. Подобраны оптимальные условия культивирования (тип и концентрация гормонального состава питательной среды) на этапе микроразмножения, укоренения и адаптации.

Ключевые слова. Волгоградский региональный ботанический сад, клональное микроразмножение, питательная среда, эксплант, ягодные культуры, *in vitro*.

Summary. *In vitro* collection of berry crops in Volgograd Regional Botanical Garden has more than 150 species, cultivars and forms of the following families and genera: Grossulariaceae DC. (*Grossularia* Mill., *Ribes* L.) Caprifoliaceae Juss. (*Viburnum* L., *Lonicera* L.), Rosaceae Adans. (*Rubus* L., *Fragaria* L.), Actinidiaceae Van-Tieghem (*Actinidia* Lindl.), Ericaceae (*Vaccinium* L.). As a result of the research, optimization of cultivation conditions at different stages of micropropagation of small fruit cultures was carried out. Optimal conditions of cultivation (type and concentration of the hormonal composition of the nutrient medium) at the stage of micropropagation, rooting and adaptation were selected.

Key words. Clonal propagation, *in vitro*, medium nutrient, plantlets, small fruit cultures.

Работы по клональному микроразмножению ягодных культур активно ведутся как российскими, так и зарубежными учеными (Hui et al, 2012; Молканова и др., 2014; Крахмалева и др., 2019;). Для большинства ягодных культур метод клонального микроразмножения разработан достаточно эффективно. Однако, в связи с постоянно меняющимся ассортиментом ягодных культур, возникает необходимость в оперативном совершенствовании технологии клонального микроразмножения на всех этапах культивирования *in vitro*. Кроме того, современные сорта ягодных культур обладают высокой урожайностью, крупноплодностью, экологической адаптивностью, пригодны к низкзатратным технологиям возделывания. Все эти факторы обуславливают актуальность использование системы *in vitro* в современном садоводстве.

В связи с этим целью наших исследований является оптимизация основных этапов клонального микроразмножения ягодных культур *in vitro*.

Генетический банк плодово-ягодных культур Волгоградского регионального ботанического сада насчитывает более 150 видов, сортов и отборных форм, представленных следующими семействами: Grossulariaceae (*Grossularia* Mill. – 10; *Ribes* L. – 10), Caprifoliaceae (*Viburnum* L. – 5, *Lonicera* L. –

28), *Rosaceae* (*Rubus* L. - 50, *Fragaria* L. - 5), *Actinidiaceae* (род *Actinidia* Lindl. – 30), *Ericaceae* (*Vaccinium* L. – 5).

Методика биотехнологических исследований с культурами изолированных тканей и органов растений основывалась как на общепринятых классических приемах работы (Бутенко, 1999), так и методах, разработанных в лаборатории биотехнологии Волгоградского регионального ботанического сада.

В качестве стерилизатора использовали различные концентрации Лизоформин® 3000 действующее вещество – глютаровый альдегид, глиоксаль и дидецилдиметиламмоний хлорид). Оптимальный режим стерилизации определяли по жизнеспособности первичных эксплантов и наличию инфекции. В качестве первичных эксплантов использовали одноглазковые черенки и меристематические участки апикальных и латеральных почек в фазе активного роста, размером 0,1–2 см. Для культивирования растений *in vitro* использовали минеральную основу питательных сред MS (Murashige, Skoog, 1962), QL (Quorin, Lepoivre, 1977), WPM (Lloyd, McCown, 1980), с добавлением 20-40 г/л углевода (сахарозы, глюкозы или фруктозы), 100 мг/л мезоинозитола, 6-8 г/л агара. Продолжительность каждого субкультивирования составляла 20–30 дней.

На этапе укоренения изучали влияние различных регуляторов роста группы ауксинов: β-индолилуксусная кислота (ИУК), β-индолилмасляная кислота (ИМК) и α-нафтилуксусная кислота (НУК) в концентрациях от 1,0 мг/л до 3,0 мг/л.

Растения культивировали при $t = 24 \pm 2$ °С, освещенностью 2500 – 5000 люкс при 16 часовом фотопериоде. Все опыты проводились в трехкратной повторности, количество вариантов в каждой повторности составляло 10 пробирок. Результаты экспериментальных данных обрабатывались статистически с помощью компьютерной программы Excel лицензионного пакета Microsoft Office 2007.

В настоящее время разработаны и используются различные схемы стерилизации в зависимости от специфики культуры и типа экспланта. Для получения стерильной культуры плодовых растений, в частности актинидии, малины, жимолости, использовали Лизоформин 3000 в концентрации 5–7 %, время экспозиции от 1 до 5 минут.

Оптимальным стерилизующим агентом для всех исследованных культур является лизоформин в концентрации 5 %, время экспозиции 3 минуты. При его использовании выход жизнеспособных эксплантов был максимальным и достигал 90 % (табл. 1).

Таблица 1

Выход жизнеспособных эксплантов в зависимости от режима стерилизации

Режим стерилизации	Выход жизнеспособных эксплантов по культурам (%)		
	<i>Actinidia</i>	<i>Lonicera</i>	<i>Rubus</i>
Лизоформин® 3000 5 %, 1 мин.	60	60	50
Лизоформин® 3000 5 %, 3 мин.	90	80	75
Лизоформин® 3000 5 %, 5 мин.	70	55	60
Лизоформин® 3000 7 %, 1 мин.	45	50	45
Лизоформин® 3000 7 %, 3 мин.	40	40	35

Для получения и поддержания активно пролиферирующей культуры *in vitro* весьма важным является правильный выбор цитокинина. Положительные результаты были получены при использовании для микроклонального размножения различных таксономических групп растений цитокининов: 6-БАП, кинетин, зеатин 2iP (Молканова и др., 2014; Муратова, 2017).

В настоящей работе использованы эти цитокинины в различных концентрациях и в сочетании с ауксинами.

Коэффициент пролиферации варьировал от 3,1 до 4,8 для *A. kolomikta* и от 4,7 до 6,8 – для *A. arguta*. Для *A. polygama* отмечено максимальное значение коэффициента размножения на средах, содержащих 6-БАП (0,5 мг/л) или Z (1,0 мг/л). Коэффициент размножения варьировал от 3,9 до 6,7.

Для всех исследуемых видов отмечено отрицательное действие тидиазурона (TDZ). На среде, содержащей тидиазурон, наблюдалось развитие аномальных листьев и сильно укороченных побегов, а концентрация 0,05 мг/л приводила к витрификации микропобегов.

Весьма успешным на этапе микроразмножения малины оказалось использование цитокинина Цитодеф (ЦФ) в концентрации 0,5 мг/л. Так, коэффициент размножения для сорта малины ремонтантной `Пингвин` на этой питательной среде составил $4,7 \pm 0,7$. При этом формировались удлиненные побеги (6,7 см), в сравнении с TDZ и 6-БАП (3,1 см) и (4,4 см) соответственно, что весьма эффективно перед этапом укоренения. При использовании 6-БАП в концентрации 1,0 мг/л, коэффициент размножения в среднем составил $7,8 \pm 0,4$, что значительно выше, чем при использовании ЦФ, при этом длина побега 4,4 см (табл. 2).

Таблица 2

Влияние регуляторов роста на коэффициент размножения *primocane raspberry* `Пингвин`

Регуляторы роста, мг/л	Длина побега, см	Коэффициент размножения, шт.
6-БАП 0,5 мг/л	$4,1 \pm 0,6$	$4,6 \pm 0,3$
6-БАП 1,0 мг/л	$4,4 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,4$
Цитодеф (ЦФ) 0,5 мг/л	$6,7 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,7$
Цитодеф (ЦФ) 1,0 мг/л	$4,9 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,2$
Тидиазурон (TDZ) 0,2 мг/л	$3,1 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,5$
Тидиазурон (TDZ) 0,5 мг/л	$2,7 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,3$

Таким образом, использование ЦФ в концентрации 0,5 мг/л целесообразно на пассаже, предшествующему этапу укоренению.

При использовании TDZ наблюдали появление витрификации, видоизменения побегов и листьев у малины.

В процессе культивирования на стадии пролиферации у побегов разных видов актинидии наблюдали спонтанное укоренение. В среднем процент спонтанного образования корней у разных видов актинидии составил 40 %. Однако для разработки промышленной технологии клонального микроразмножения видов и сортов актинидии данные показатели являются недостаточными. По такому показателю как длина корней и число корней оптимальным является использование ИУК в концентрации 0,5 мг/л по сравнению с ИМК. При этом количество укорененных растений составляло 100 %.

Для малины на этапе укоренения оптимальным является использование $\frac{1}{2}$ минеральной основы базовой среды МС, дополненной β -индолилуксусной кислотой (ИУК) в концентрации 1,0 мг/л.

Максимальные показатели длины корней жимолости наблюдали на питательной среде WPM при использовании в качестве ауксина ИУК, что соответствует данным других исследователей (Муратова, 2017; Hui et al, 2012). Однако наибольший процент адаптированных растений (до 90 %) наблюдается после культивирования на средах WPM, содержащих ИМК в концентрации 1,0 мг/л. Отмечено, что на данной питательной среде происходит лучшее развитие корневой системы у жимолости, особенно корней второго порядка.

По нашим данным, использование двухстадийной адаптации дает положительный эффект для плодово-ягодных культур. В первые две недели необходимо поддерживать относительную влажность 75–80 %. Это можно обеспечить, создав условия «влажной камеры» с ежедневным кратковременным проветриванием. Температура должна быть не выше 25 °С и не ниже 20 °С. Необходимо обеспечить освещенность 2500 тыс. люкс.

Оптимальными сроками адаптации растений–регенерантов ягодных культур является январь–март. Высадка растений в эти сроки позволяет получить к маю адаптированные саженцы.

В качестве субстрата используется смесь торфа, песка и вермикулита в соотношении 1:1:1. Выход адаптированных растений составляет 75–90 %.

Весьма успешно для жимолости зарекомендовала двух стадийная адаптация. Растения-регенеранты высаживаются в маленькие рассадные касеты с кислым торфом, а затем через 2-3 недели пе-

ресаживают в контейнеры большего объема в субстрат, содержащий торф и песок в соотношении 1:1. При данном способе адаптации выход растений составил 90 %. Если растения регенеранты жимолости высаживать в контейнеры большого объема, происходит закисление субстрата и выход адаптированных растений снижается до 50–60 %. Товарного качества саженцы жимолости достигают на второй год культивирования (рис.). Так как культура достаточно зимостойкая, период покоя рекомендуется проводить в открытом грунте, а не в теплице.



Рис. 1. Адаптированные саженцы жимолости на второй год культивирования (фото Е. В. Малаева).

В результате проведенных исследований нами установлено, что оптимальным стерилизующим агентом для всех исследованных ягодных культур является Лизоформин® 3000 в концентрации 5 %, время экспозиции 3 минуты. При этом режиме получено 90 %, 80 % и 75 % эксплантов актинидии, жимолости и малины соответственно, свободных от контаминации.

Выявлен оптимальный тип и концентрация цитокининов и их сочетание с ауксинами на этапе микроразмножения. Так, для *A. kolomikta* и *A. arguta* оптимальным является использование 2 iP (5,0 мг/л); для *A. polygama* – 6-БАП (0,5 мг/л) или Z (1,0 мг/л). Для малины ремонтантного типа оптимальное сочетание длины побега и коэффициента размножения наблюдали на питательной среде, содержащей цитодеф (ЦФ) в концентрации 0,5 мг/л. Наибольший коэффициент размножения жимолости наблюдали на среде, дополненной 6-БАП 1,0 мг/л+ИМК 0,5 мг/л.

На этапе укоренения для актинидии оптимальной является концентрация ИУК 0,5 мг/л; для малины ремонтантного типа – ИУК 1,0 мг/л; для жимолости – ИМК 1,0 мг/л.

ЛИТЕРАТУРА

Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.

Крахмалева И. Л., Молканова О. И., Малаева Е. В. Использование клонального микроразмножения для разных форм перспективных сортов *Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim) Maxim // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада, 2019. – Вып. 133. – С. 80–86.

Молканова О. И., Козак Н. В., Коновалова Л. Н., Малаева Е. В. Биологические особенности дальневосточных видов рода *Actinidia Lindl.* // Вестник Удмуртского Университета, 2014. – Вып. № 6–1. – С. 42–48.

Муратова С. А. Биотехнологические аспекты размножения плодовых и ягодных культур // Сборник научных трудов ГНБС, 2017. – Т. 144(2). – С. 84–89.

Hui J. X., Wen S. Ch., Hua Z. Y., Ming L. X. Comparative study on different methods for *Lonicera japonica* Thunb. micropropagation and acclimatization // J. Med Plant Res., 2012. – V. 6. – P. 4389 – 4393.

Lloid G. B., McCown B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture // Comb. Proc. Intl. Plant. Propagators Soc., 1980. – V. 30. P. 421–442.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Phsiol. Plant, 1962. – Vol. 15. – N 3. – P. 473–497.

Quoirin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus* // Acta Hortic., 1977 – V. 78. – P. 437–442.