

УСКОРЕННОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ГОЛУБИКИ ТОПЯНОЙ *IN VITRO*

Введение

Голубика топяная (*Vaccinium uliginosum* L.) является одним из сравнительно недавно введенных в культуру ягодных растений, перспективным для Сибирского региона. В ЦСБС отобраны перспективные формы, а также проводится селекционная работа по выведению новых сортов. В последнее время наряду с традиционными способами размножения растений все большее значение приобретает использование для этих целей биотехнологических подходов, которые для целого ряда сортов и форм растений являются безальтернативными. К числу таких представителей относится и отборная форма № 3 голубики топяной, так как широкому распространению этой новой ягодной культуры препятствуют трудности при использовании традиционного метода вегетативного размножения – зеленого черенкования. Для голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) метод размножения *in vitro* является экономически выгодным [1, 2, 3].

Основной целью исследований явилось изучение особенностей ускоренного размножения голубики топяной в культуре пазушных почек *in vitro*.

Объекты и методы

Объект исследования – отборная форма № 3 голубики топяной. Исследования проводились в 2004-2007 гг. в лаборатории биотехнологии ЮСБС. В качестве первичного растительного материала использовали побеги с почками, взятые с растений весной, в начале набухания. Почку в течение 30 минут стерилизовали в 0,2%-ном растворе сулемы, промывали в стерильной дистиллированной воде. С использованием стереомикроскопа из них вычленили меристемы размером 0,5 мм, которые культивировали на агаризованной питательной среде (рН5,5) по прописи Андерсона (А), дополненные в 0-пассаже 5 мкМ изопентиладенина (ИПА).

На стадии собственно размножения изучено влияние различных концентраций

ИПА (0,5-20 мкМ) на рост и развитие пазушных почек. В качестве индукторов ризогенеза использованы ауксины: 3-индолмасляная кислота (ИМК) (2-5 мкМ) и 3-индолпропионовая кислота (ИПК) (5-10 мкМ). Адаптацию растений-регенерантов проводили на гидропонной установке «Минивит 0,35», заполненной питательным раствором минеральных солей по прописи S A. Продолжительность пассажа составляла 30-35 суток. 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.), длина корней (мм), наличие боковых корней (+, -).

Экспланты культивировали в следующих условиях: фотопериод – 16/8 ч свет/темнота, освещенность – 2-3 клк, 24±1°C.

Результаты и их обсуждение

При введении эксплантов *in vitro* указанный режим поверхностной стерилизации пазушных почек оказался приемлемым и эффективным. Кроющие чешуи почек оказались 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.

Побеги, развившиеся в культуре изолированных меристем, переносили на свежие питательные среды того же состава для доращивания. К концу 1-го пассажа они достигали 25-30 мм. Фрагменты побегов с пазушными почками были использованы в последующих экспериментах для изучения влияния концентрации ИПА на ростовые процессы (рис. 1, 2).

Концентрация цитокинина оказала влияние на регенерацию адвентивных побегов, развивающихся в основании пазушных почек, а также на индукцию пазушного побегообразования. Как известно, оба эти

процесса оказывают влияние на коэффициент размножения (рис. 3). Использование 0,5 мкМ ИПА стимулировало развитие только одного побега, тогда как повышение концентрации цитокинина до 2 мкМ индуцировало развитие 1-2 пазушных побегов у 40% эксплантов; 5 мкМ ИПА – 1-2 пазушных побегов (60% эксплантов) и 3-5 адвентивных почек (50% эксплантов); 10 мкМ ИПА – 6-10 адвентивных почек (100% эксплантов). Введение в состав питательной среды 20 мкМ цитокинина приводило к развитию большого количества адвентивных почек (более 15 шт.), однако побеги развивались мед-

ленно, и большая их часть была гипергидратирована. При микроразмножении у некоторых культур наблюдается феномен гипергидратации (витрификации). Одной из причин витрификации может быть использование высоких концентраций цитокининов. Например, при микроразмножении *Prunus cerasifera* оптимальным было присутствие в среде 1,78-6,6 мкМ БАП, тогда как при повышении концентрации БАП до 22,2 мкМ происходило оводнение побегов, что в дальнейшем приводило к их гибели [4].

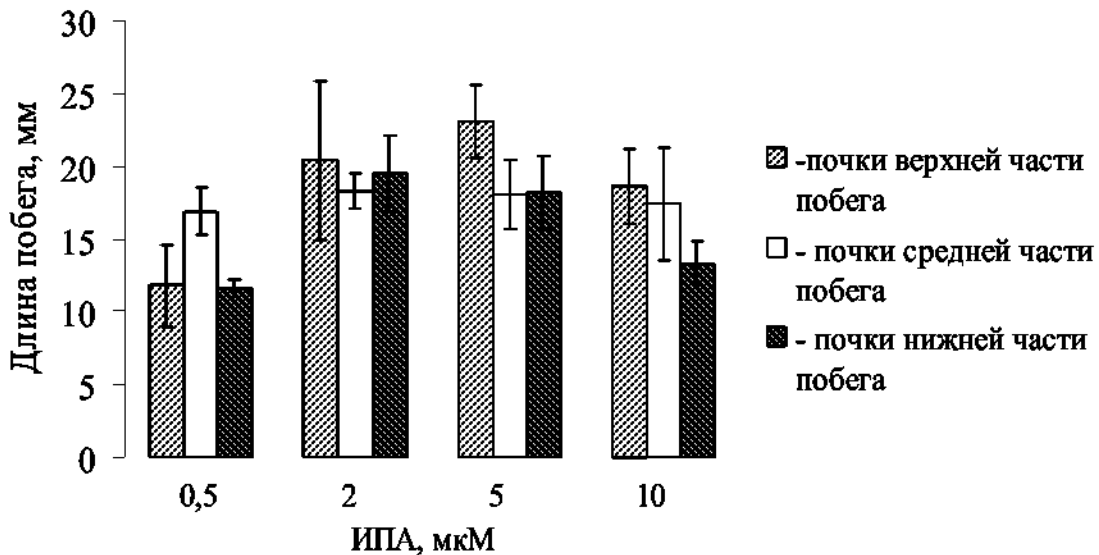


Рис. 1. Влияние ИПА на длину доминирующего побега *Vaccinium uliginosum* в культуре пазушных почек *in vitro*

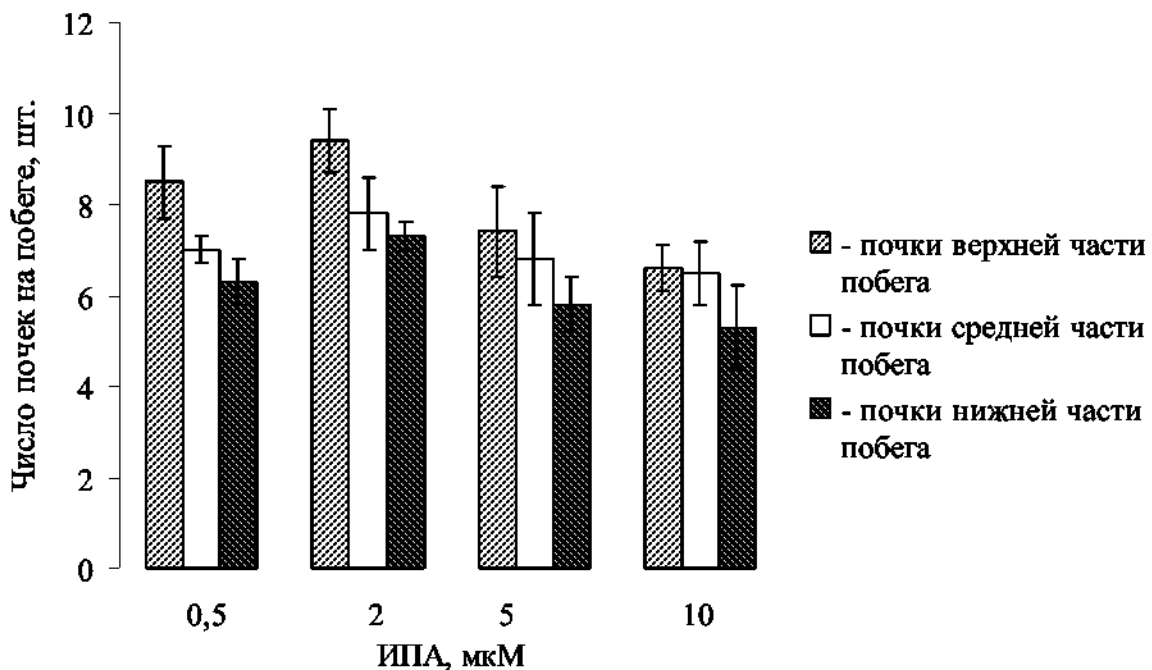


Рис. 2. Влияние ИПА на количество почек у доминирующего побега *Vaccinium uliginosum* в культуре пазушных почек *in vitro*

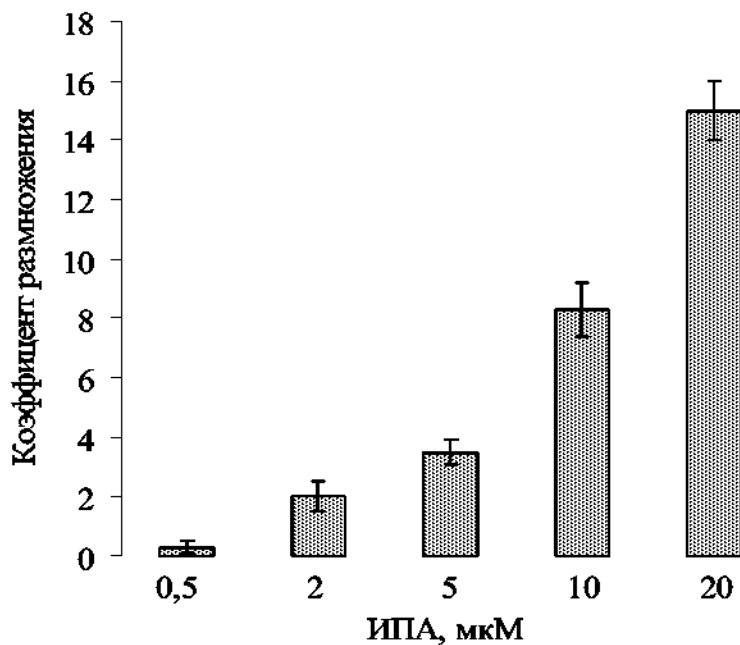


Рис. 3. Влияние ИПА на коэффициент размножения *Vaccinium uliginosum* в культуре пазушных почек *in vitro*

Для преодоления эффекта гипергидратации и сохранения высокого коэффициента размножения был использован следующий подход: в течение двух недель пазушные почки выращивали на среде с 20 мкМ ИПА, а затем переносили на среду с пониженной концентрацией цитокинина. В случае, когда концентрацию ИПА снижали до 10 мкМ, развивался конгломерат высоких побегов (35-45 мм) с мелкими листьями (15-20 шт.) (рис. 4а), снижение концентрации цитокинина до 5 мкМ приводило к развитию конгломерата из 8-12 побегов высотой 30-35 мм с более крупными листьями (рис. 4б), а при пересадке на безгормональную среду развивалось от 6-8 шт. невысоких побегов (10-15 мм).

Важным этапом микроразмножения является укоренение полученных побегов или микрочеренков. При использовании микрочеренков значительно возрастает коэффициент размножения. Решающее значение при укоренении оказывает выбор индуктора ризогенеза – ауксина, подбор оптимальных его концентраций.

Из всех ауксинов наиболее часто применяют ИМК. Например, для голубики высокорослой был использован этот ауксин [5]. Для укоренения голубики топяной побеги делили на микрочеренки с одной или двумя пазушными почками и помещали их на среды с различными концентрациями ИМК. К концу пассажа у определенного количества эксплантов, в зависимости от концентрации ИМК, развивались

корни (табл. 1), на среде без ауксина корней не было. На базальной части микрочеренков отметили образование каллуса, причем с повышением концентрации ИМК каллусогенез уменьшался, а ризогенез происходил с большей интенсивностью.

Отметили некоторые морфологические особенности регенерантов, укорененных на средах с разными концентрациями ИМК: у регенерантов на среде с 15 мкМ ИМК на побегах развивалось меньшее количество листьев. Листья были более мелкие по сравнению с листьями регенерантов, полученными на среде с 5 мкМ ИМК. Хотя такой показатель, как частота укоренения на этих средах был почти одинаков (80 и 75% соответственно).

Другие ауксины (1-нафтилуксусная кислота, 3-индолилуксусная кислота, 3-индолилпропионовая кислота) для укоренения используются реже. Один из таких ауксинов – ИПК был изучен нами в качестве стимулятора ризогенеза для микрочеренков голубики топяной (табл. 2).

Для некоторых растений использование ИПК также оказалось эффективно для корнеобразования. Например, применение этого ауксина целесообразно для *Rosmarinus officinalis* [6], гибридов рода *Primula* [7]. При изучении действия ИПК на микрочеренки голубики топяной выявлено, что этот ауксин проявил лучший стимулирующий эффект, чем ИМК:

- на 7-10 суток раньше отмечено появление корней;

- частота укоренения выше (95 и 80% соответственно);

- при всех испытанных концентрациях этого ауксина не было отмечено появления каллуса на базальной части микрочеренка;

- формировалась более развитая корневая система за счет лучшего роста корней в длину и образования большего количества боковых корней.

Полученные растения-регенеранты в течение 4-5 недель адаптировали к условиям выращивания *ex vitro* (рис. 5).



а



б

Рис. 4. Побеги *Vaccinium uliginosum*, развившиеся на среде Андерсона с 10 мкМ ИГА (а) и 5 мкМ ИГА (б)

Таблица 1

Характеристики регенерантов *Vaccinium uliginosum*, укорененных на среде с ИМК (n= 40)

ИМК, мкМ	Укоренение, %	Количество корней, шт.	Длина корней, мм	Корни второго порядка, +, -
2	7,5	2	6-8	+
5	80	2-4	8-15	+
10	68	2-3	8-12	+
15	75	3-4	10-30	+

Таблица 2

Характеристики регенерантов *Vaccinium uliginosum*, укорененных на среде с ИПК

ИПК, мкМ	Количество эксплантов, шт.	Укоренение, %	Количество корней, шт.	Длина корней, мм	Корни второго порядка, +, -
5	40	17,5	2	1-3	+
7	500	85	4-5	20-50	+
10	1000	95	4-7	20-75	+

Этап адаптации завершает весь процесс размножения *in vitro*. Он необходим для восстановления растениями-регенерантами целого ряда утраченных функций. Во-первых, у регенерантов понижено количество кутикулярного воска и слабо развита хлоренхима; во-вторых, они характеризуются гетеротрофным питанием и пониженной фотосинтетической способностью; в-третьих, нарушенная деятельность устьичного аппарата листьев приводит к потере большого количества воды и

необратимому обезвоживанию растений-регенерантов.

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 S A. На одной установке «Минивит 0,35» (0,35 м²) можно одновременно адаптировать до 1000 растений-регенерантов голубики. Выход адаптированных к условиям выращивания *ex vitro* растений голубики составил 100%.



Рис. 5. Растения-регенеранты *Vaccinium uliginosum* в конце периода адаптации на гидропонной установке «Минивит 0,35»

Заключение

В результате наших исследований показана возможность ускоренного размножения *in vitro* *Vaccinium uliginosum*. Для получения высокого коэффициента размножения необходимо использовать питательную среду по прописи Андерсона и культивировать пазушные почки первые две недели на этой среде, дополненной 20 мкМ ИПА, а затем перенести их на среду с 5 мкМ ИПА. На стадии укоренения лучшим индуктором ризогенеза является ИПК в концентрации 10 мкМ. Это позволяет укоренить 95% микрочеренков голубики. Все растения-регенеранты успешно проходят период адаптации к условиям выращивания *ex vitro* на гидропонной установке. Несомненно, что предложенный способ вегетативного размножения (*in vitro*) имеет большие преимущества перед традиционным способом. Размножение *in vitro* может быть применено как в селекционной работе для ускоренного размножения новых гибридов, так и при крупномасштабном размножении отобранных ценных форм этой перспективной для сибирского региона ягодной культуры.

Библиографический список

1. Иванович А.А. Микрочлониальное размножение голубики высокой / А.А. Иванович // Интенсиф. плодово-

щевод.; Белорус. с.-х. акад. Горки, 1992. С. 47-50.

2. Попович Е.А. Влияние экзогенного цитокинина на жизнеспособность эксплантов голубики высокой *in vitro* / Е.А. Попович, В.Л. Филипеня // Физиол. раст. 1997. № 1. С. 104-107.

3. Сидорович Е.А. Клональное микро-размножение интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной в культуре *in vitro* в связи с генотипами / Е.А.Сидорович, Е.Н. Кутас // Вести АН Беларуси. Сер. биол. науки. Минск, 1998. № 3. С. 5-9.

4. Лесникова Н.П. Микро-размножение *in vitro* алычи (*Prunus cerasifera* EHRH.) как возможность ускорения селекционного процесса / Н.П. Лесникова, А.Н. Сусский, В.М. Горина // Бюл. Никитского бот. сада. 2002. Вып. 86. С. 57-58.

5. Сидорович Е.А. Клональное микро-размножение новых плодово-ягодных растений / /Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас // Минск: Наука і тэхніка, 1996. 246 с.

6. Chaturvedi H. *In vitro* multiplication of *Rosmarinus officinalis* L. / H. Chaturvedi, P. Misra, M. Sharma // Z. Pflanzenphysiol. 1984. 113. № 4. P. 301-304.

7. Бородулина И.Д. Размножение двух гибридных видов рода *Primula* L. в культуре *in vitro* / И.Д. Бородулина, Н.А. Вечернина, З.В. Долганова // Растительные ресурсы. 2001. Вып. 4. С. 114-122.

