

УДК 581.143.6:634.7

**РАЗРАБОТКА СОСТАВОВ
ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД
ДЛЯ ИНТРОДУКЦИИ
В КУЛЬТУРУ IN VITRO
ЭКСПЛАНТОВ СОРТОВ МАЛИНЫ
И КРЫЖОВНИКА**

Бунцевич Леонид Леонтьевич
канд. биол. наук
зав. лабораторией вирусологии

Беседина Екатерина Николаевна
мл. научный сотрудник

Костюк Марина Александровна
мл. научный сотрудник

Макаркина Марина Викторовна
мл. научный сотрудник

*Государственное научное учреждение
Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт садоводства
и виноградарства ФАНО России,
Краснодар, Россия*

Культивирование меристем методом клонального микроразмножения – это основной способ получения качественного безвирусного посадочного материала плодово-ягодных культур и винограда. Высокая специфичность реакции эксплантов сортов малины и крыжовника на состав питательной среды требует индивидуального подбора компонентов среды для наиболее успешного размножения in vitro оздоравливаемых растений. Настоящая работа выполнена в центре размножения плодовых, ягодных культур и винограда СКЗНИИСиВ. Объектом исследования и совершенствования явилась методика производства оздоровленного посадочного материала сортов малины и крыжовника. В статье представлены результаты исследований по культивированию меристем малины и

UDC 581.143.6:634.7

**DEVELOPING OF NUTRIENT
MEDIUMS' COMPOSITIONS
FOR INTRODUCTION
IN VITRO CULTURE OF PLANTLETS
OF VARIETIES OF RASPBERRY
AND GOOSEBERRY**

Buntsevich Leonid
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Virology

Besedina Catherine
Junior Research Associate

Kostyuk Marina
Junior Research Associate

Makarkina Marina
Junior Research Associate

*State Scientific Organization North
Caucasian Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture
of FASO of Russia,
Krasnodar, Russia*

The meristem's cultivation by a method of clonal microreproduction is the main way of production a qualitative virus-free landing material of fruits, berries and grapes cultures. High specificity of raspberry and gooseberry plantlet's reaction on composition of nutrient medium during cultivation demands the individual selection of medium's components for the most successful reproduction in vitro of revitalized plants. This work is carried out in the Center of reproduction of fruit, berry crops and grapes of NCRRIH&V. Object of research and improvement was the using now technique of production of the revitalized landing material of raspberry and a gooseberry varieties. The results of research on cultivation of raspberry and gooseberry meristems in vitro are presented in the article;

крыжовника *in vitro*; изучена эффективность различных питательных сред: Андерсона, Ли де Фоссарда и четырех модификаций Мурасиге-Скуга (с различным содержанием биологически активных веществ и глицина). В результате проведенных исследований установили, что наиболее эффективная интродукция в культуру *in vitro* экспериментальных сортов малины и крыжовника (приживается 92% меристем) происходит на питательной среде Мурасиге и Скуга (1962), содержащей макро- и микроэлементы по прописи, витамины С – 1,0 мг/л, В₁ – 1,0 мг/л, В₆ – 0,5 мг/л, никотиновую кислоту – 0,5 мг/л, инозитол – 100 мг/л, сахарозу 20 г/л, агар-агар – 8 г/л, с удвоенным содержанием хелата железа и без добавления аминокислоты глицин.

Ключевые слова: КУЛЬТУРА IN VITRO, ЭКСПЛАНТЫ, МАЛИНА, КРЫЖОВНИК, СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА, КАЧЕСТВЕННЫЙ БЕЗВИРУСНЫЙ ПОСАДОЧНЫЙ МАТЕРИАЛ

the efficiency of various nutrient mediums is studied: Anderson, Lee De Fossard and 4 modifications of Murashige and Skoog (with various concentrations of biologically active substances and glycine). As a result of the research it is established that the most effective introduction *in vitro* culture of experimental varieties of raspberry and gooseberry (92% of meristems get accustomed) occurs on Murashige and Skoog nutrient medium (1962) containing macro- and microelements by recipe, vitamins С – 1,0 mg/l, В₁ – 1,0 mg/l, В₆ – 0,5 mg/l, nicotinic acid – 0,5 mg/l, inositol – 100 mg/l, sucrose of 20 g/l, agar-agar – 8 g/l with the doubled content of iron chelate and without glycine amino acid.

Key words: IN VITRO CULTURE, PLANTLETS, RASPBERRY, GOOSEBERRY, GROWTH STIMULATORS, HIGH-QUALITY VIRUS-FREE LANDING MATERIAL

Введение. Основным способом получения качественного безвирусного посадочного материала является культивирование меристем методом клонального микроразмножения [1-5]. Процесс клонального микроразмножения принято делить на четыре этапа: введение экспланта в культуру *in vitro*; собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов; укоренение размножаемых побегов *in vitro*; адаптация укоренившихся побегов к почвенным условиям. Начиная с этапа ввода эксплантов в культуру *in vitro* существует проблема специфичности морфо- и органогенетической реакции сортов растений на активность ростовых веществ, витаминов, макро- и микроэлементов и их композиций. Как правило, сорта культурных растений нуждаются в индивидуальном под-

боре компонентов питательных сред и их соотношений для наиболее эффективного управления ростом и развитием эксплантов *in vitro* [6-7].

Как известно из литературных данных, ростом, дифференциацией, органоогенезом растений управляют ростовые вещества или фитогормоны [8, 9]. Так, цитокинины стимулируют у листьев рост в фазе растяжения, а также клеточные деления. Они осуществляют общую стимуляцию обмена веществ, что проявляется в усилении биосинтеза нуклеиновых кислот и белков и значительно замедляют старение клеток, способны вызывать вторичное зеленение пожелтевших листьев.

В ряде случаев цитокинины стимулируют образование фенольных веществ и пигментов. Усиление биосинтетических процессов под влиянием цитокининов способствует притоку аминокислот, фосфатов и т.д. к местам, где они локализуются (растущие плоды, семена, клубни), проявляется так называемая аттрагирующая активность цитокининов. Кроме того, цитокинины вызывают заложение и рост стеблевых почек у недифференцированных каллусов [8, 9].

Гиббереллины усиливают рост стеблей за счет вытягивания, но не увеличения числа междоузлий, вызывают прорастание семян и образование партенокарпических плодов, индуцируют стрелкование розеточных форм растений, нарушают период покоя. Стимулируя рост стебля, гиббереллин одновременно способен подавлять рост боковых побегов и корней, уменьшать размеры листьев.

Ауксины активируют рост отрезков coleoptилей, стеблей, листьев, корней, вызывают трофические изгибы, стимулируют образование корней у черенков растений. При культивировании микрорастений *in vitro* наиболее важным у цитокининов является свойство вызывать заложение и рост дополнительных розеток у недифференцированных каллусов, у ауксинов – способ-

ность стимулировать образование корней у микрочеренков растений, а у гиббереллинов – усиливать рост стеблей за счет вытягивания [8, 9].

Актуальность работы определяется высокой специфичностью реакции эксплантов сортов малины и крыжовника на состав питательной среды, требующей индивидуального подбора стимуляторов роста и других компонентов среды для наиболее успешного ввода в культуру *in vitro* эксплантов оздоравливаемых растений.

Цель исследования – разработать оптимальные составы питательных сред для интродукции эксплантов экспериментальных сортов *in vitro* в процессе клонального микроразмножения и оздоровления малины и крыжовника.

Объекты и методы исследований. Работа выполнена в центре размножения плодовых, ягодных культур и винограда СКЗНИИСиВ. Объектом исследования и совершенствования явилась методика производства оздоровленного посадочного материала малины и крыжовника. В исследованиях использован биоматериал малины сорта Геракл и крыжовника сорта Юбилейный. Методики исследований общеприняты [10-15].

Обсуждение результатов. На этапе ввода в культуру *in vitro* эксплантов сортов малины и крыжовника изучили питательные среды Андерсона, Ли де Фоссарда, Мурасиге и Скуга. На питательных средах Андерсона и Ли де Фоссарда (табл. 1) у эксплантов экспериментальных сортов малины и крыжовника при их интродукции установлен низкий уровень приживаемости меристем (табл. 2).

На среде Андерсона приживаемость составила, в среднем, 3,2 %; на среде Ли де Фоссарда – 6,8 %. В дальнейшем эти меристемы плохо развивались и были сняты с пассирования.

Таблица 1 – Состав питательных сред Андерсона и Ли де Фоссарда для интродукции *in vitro* эксплантов сортов малины, ежевики, крыжовника

Состав питательной среды, мг/л	Питательная среда	
	Андерсона	Ли де Фоссарда
Макро-элементы	NH ₄ NO ₃ – 400; KNO ₃ – 480; MgSO ₄ · 7H ₂ O – 180; Na ₂ PO ₄ · H ₂ O – 330,6; CaCl ₂ – 322,2	NH ₄ NO ₃ – 800; KNO ₃ – 1010; MgSO ₄ · 7H ₂ O – 370; Na ₂ PO ₄ · H ₂ O – 138; CaCl ₂ – 29,4; NaSO ₄ – 63,9
Микро-элементы	M ₃ BO ₃ – 6,2; MnSO ₄ · 4H ₂ O – 16,9; ZnSO ₄ · 7 H ₂ O – 8,6; KJ- 0,3; Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O – 0,25; CuSO ₄ · 5H ₂ O – 0,0025; CoCl ₂ · 5H ₂ O – 0,025	M ₃ BO ₃ – 3,1; MnSO ₄ · 4H ₂ O – 11,1; ZnSO ₄ · 7 H ₂ O – 5,8; KJ – 0,4; Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O – 0,024; CuSO ₄ · 5H ₂ O – 0,025; CoCl ₂ · 5H ₂ O – 0,118
Fe-хелат	FeSO ₄ · 7H ₂ O – 55,7; Na ₂ – ЭДТА – 74,5	FeSO ₄ · 7H ₂ O – 13,9; Na ₂ – ЭДТА – 16,8
Витамины	B ₁ , B ₆ , PP – 0,5; C – 1,5; меноинозит – 100	B ₁ , B ₆ , PP – 0,5; C – 1,0
Фитогормоны	6-БАП – 0,5	6-БАП–0,5; фолиевая к-та-1,0
Сахара	сахароза – 20 г/л	сахароза – 20 г/л

Таблица 2 – Результаты интродукции меристем экспериментальных сортов малины, ежевики, крыжовника при посадке на питательные среды Андерсона и Ли де Фоссарда

Образец	Среда Андерсона			Среда Ли де Фоссарда		
	посажено, шт.	прижилось, шт.	%	посажено, шт.	прижилось, шт.	%
Малина, сорт Геракл	30	2	6,6	28	1	3,6
Крыжовник, сорт Юбилейный	32	0	0	31	3	9,7
в среднем	62	2	3,2	59	4	6,8

Питательную среду Мурасиге-Скуга (М-С) модифицировали в четырёх вариантах (табл. 3). Все варианты содержали макро- и микроэлементы стандартные по прописи М-С (1962); витамины: С – 1,0 мг/л; В₁ – 1,0 мг/л, В₆ – 0,5 мг/л, никотиновую кислоту – 0,5 мг/л; инозитол – 100 мг/л, двойное содержание хелата железа, сахарозу 20 г/л, агар-агар – 8 г/л.

В состав первого варианта (М-С 1) дополнительно введён 6-БАП 0,6 мг/л, аминокислота глицин 4 мг/л.

Во втором варианте (М-С 2): 6-БАП - 0,5 мг/л, глицин 4 мг/л.

В третьем варианте (М-С 3): 6-БАП - 0,6 мг/л, глицин отсутствует.

В четвёртом варианте (М-С 4): 6-БАП - 0,5 мг/л, глицин отсутствует.

Таблица 3 – Варианты питательной среды Мурасиге и Скуга для интродукции *in vitro* эксплантов малины, ежевики, крыжовника

Состав	Модификация среды МС, мг/л			
	М-С 1	М-С 2	М-С 3	М-С 4
Макроэлементы	стандарт	стандарт	стандарт	стандарт
Микроэлементы	стандарт	стандарт	стандарт	стандарт
Fe-хелат	удвоенное содержание	удвоенное содержание	удвоенное содержание	удвоенное содержание
Витамины	С-1; В ₁ -1; В ₆ 0,5; РР-0,5; инозитол-100	С-1; В ₁ -1; В ₆ 0,5; РР-0,5; инозитол-100	С-1; В ₁ -1; В ₆ 0,5; РР-0,5; инозитол-100	С-1; В ₁ -1; В ₆ 0,5; РР-0,5; инозитол-100
Глицин	4	4	-	-
6-БАП	0,6	0,5	0,6	0,5
Сахароза	20000	20000	20000	20000
Агар-агар	8000	8000	8000	8000

Результаты интродукции меристем изучаемых сортов малины, крыжовника при посадке на модифицированную среду Мурасиге-Скуга представлены в табл. 4.

Таблица 4 – Результаты интродукции меристем сортов малины, ежевики, крыжовника при посадке на модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга

Образец	М-С 1			М-С 2			М-С 3			М-С 4		
	посажено, шт.	прижилось, шт.	%									
Малина, сорт Геракл	32	27	84	30	25	83	33	29	87	31	28	90
Крыжовник, сорт Юбилейный	30	25	83	33	28	85	31	28	90	30	28	93
в среднем	62	52	84	63	53	84	64	57	89	61	56	92

Анализ результатов исследования показывает, что в четвёртом варианте модифицированной среды Мурасиге-Скуга (М-С 4) приживаемость эксплантов по сортам имела максимальный уровень (в среднем 92 %).

У крыжовника выход прижившихся меристем больше (93 %), чем у малины (90%). Выделившийся вариант питательной среды отличается содержанием 6-БАП 0,5 мг/л и отсутствием аминокислоты глицин.

Несколько ниже эффективность интродукции меристем в культуру *in vitro* на питательной среде М-С 3 (89 %). Её состав отличается от М-С 4 большим содержанием 6-БАП (0,6 мг/л).

На питательных средах, содержащих аминокислоту глицин (М-С 1 и М-С 2), уровень приживаемости меристем экспериментальных пород и сортов *in vitro* ещё ниже и составляет 84 % (см. табл. 4).

Выводы. В результате проведённых исследований установлено, что наиболее эффективная интродукция в культуру *in vitro* сортов малины и крыжовника (приживается 92 % меристем) происходит на питательной среде Мурасиге и Скуга (1962), содержащей макро- и микроэлементы по прописи, витамины С – 1,0 мг/л, В₁ – 1,0 мг/л, В₆ – 0,5 мг/л, никотиновую кислоту – 0,5 мг/л; инозитол – 100 мг/л, сахарозу 20 г/л, агар-агар – 8г/л., с удвоенным содержанием хелата железа, без добавления аминокислоты глицин.

Модификации среды М-С, содержащие аминокислоту глицин, показали меньшую эффективность интродукции в культуру *in vitro* экспериментальных сортов малины и крыжовника (84 %).

Приживаемость меристем на питательной среде М-С без глицина, но с повышенным содержанием цитокинина (6-БАП 0,6 мг/л) слабее (89 %), чем в варианте с содержанием 6-БАП 0,5 мг/л. На питательных средах Андерсона и Ли де Фоссарда приживаемость эксплантов изучаемых сортов крыжовника и малины низкая – 3-7 %.

Литература

1. Рекомендации по выращиванию безвирусного посадочного материала плодово-ягодных культур и винограда / сост. В.А. Высоцкий.– М.: Колос, 1980. – 37 с.
2. Муратова, С.А. Особенности введения в культуру *in vitro* плодовых и ягодных растений / С.А. Муратова, М.Б. Янковская, Д.Г. Шорников [и др.] // Плодоводство.– ИП НАН Беларуси. – Самохваловичи, 2005. – Т. 17, Ч. 2. – С. 102-104.
3. Zimmerman, R.H. Fruit plants micropropagation at Beltsville Fruit Laboratory and in North America / R.H. Zimmerman // Rev. Ortoflorofruit. I.t. - 1980. - V. 64, № 3. - P. 241-256.
4. Bertsouklis K.F., Papafotiou M. In vitro propagation of arbutus andrachne L. Acta Horticulturae 813: VI International Symposium on New Floricultural Crops. http://www.actahort.org/books/813/813_63.htm

5. Высоцкий, В.А. Клональное микроразмножение растений / В.А. Высоцкий // Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – С. 91-102.

6. Бунцевич, Л.Л. Исследование эффективности антибиотиков и стерилизаторов нового поколения для подавления бактериальной и грибной контаминации среды и эксплантов / Л.Л. Бунцевич, Е.Н. Палецкая, М.А. Костюк, Н.И. Медведева // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс].– Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2012. – № 16(4).– С. 44-53. Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/12/04/06.pdf>.

7. Larraburu E.E., Apóstolo N. M., Llorente B. E. In Vitro Propagation of Pink Lapacho: Response Surface Methodology and Factorial Analysis for Optimisation of Medium Components // International Journal of Forestry Research V. 2012 (2012), Article ID 318258, 9 p.

8. Бутенко, Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений /Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 287 с.

9. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнология на их основе: Учебное пособие / Р.Г. Бутенко.– М.: МФБК-ПРЕСС, 1999.– 160 с.

10. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / под ред. Е.Н. Джигадло. – Орёл: ГНУ ВНИИСПК. – 2005. – 50 с.

11. Высоцкий, В.А. Особенности клонального микроразмножения некоторых форм ремонтантной малины / В.А. Высоцкий // Плодоводство и ягодоводство России: сб. научных трудов ВСТИСП.– М., 1996.– Т.3.– С. 90-95.

12. Высоцкий, В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве / В.А. Высоцкий // Садоводство и виноградарство. – 2006. – №2. – С. 2-3.

13. Попов, Ю.Г. Оздоровление и размножение плодовых и ягодных растений методом культуры меристематических верхушек: методические указания / Ю.Г. Попов, В.А. Высоцкий. – М.: ВАСХНИЛ, 1979. – 29 с.

14. Трушечкин, В.Г. Методические указания по технологии производства оздоровленного посадочного материала плодовых и ягодных культур высших категорий / В.Г. Трушечкин, Ф.Я. Поликарпова, В.А. Высоцкий [и др.]. – М.: НИЗИСНП, 1986. – 44 с.

15. Упадышев, М.Т. Теоретические основы и практические аспекты оздоровления плодовых и ягодных культур от вирусов / М.Т. Упадышев // Плодоводство и ягодоводство России, 2011.– Т. 26. – С. 109-118.

References

1. Rekomendatsii po vyraschivaniyu bezvirusnogo posadochnogo materiala plodovo-yagodnyh kul'tur i vinograda / sost. V.A. Vysotskiy.– М.: Kolos, 1980. – 37 s.

2. Muratova, S.A. Osobennosti vvedeniya v kul'turu in vitro plodovyh i yagodnyh rasteniy / S.A. Muratova, M.B. Yankovskaya, D.G. Shornikov [i dr.] // Plodovodstvo.– IP NAN Belarusi. – Samohvalovich, 2005. – Т. 17, Ch. 2. – S. 102-104.

3. Zimmerman, R.H. Fruit plants micropropagation at Beltsville Fruit Laboratory and in North America / R.H. Zimmerman // *Rev. Ortoflorofruit. I.t.* - 1980. - V. 64, № 3. - P. 241-256.

4. Bertsouklis K.F., Papafotiou M. In vitro propagation of arbutus andrachne L. *Acta Horticulturae* 813: VI International Symposium on New Floricultural Crops. http://www.actahort.org/books/813/813_63.htm

5. Vysotskiy, V.A. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rasteniy / V.A. Vysotskiy // *Kul'tura kletok rasteniy i biotekhnologiya*. – M.: Nauka, 1986. – S. 91-102.

6. Buntsevich, L.L. Issledovanie effektivnosti antibiotikov i sterilizatorov novogo pokoleniya dlya podavleniya bakterial'noy i gribnoy kontaminatsii sredy i eksplantov / L.L. Buntsevich, E.N. Paletskaya, M.A. Kostyuk, N.I. Medvedeva // *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii [Elektronnyj resurs]*.– Krasnodar: SKZNIISiV, 2012. – № 16(4).– S. 44-53. Rezhim dostupa: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/12/04/06.pdf>.

7. Larraburu E.E., Apóstolo N. M., Llorente B. E. In Vitro Propagation of Pink Lapacho: Response Surface Methodology and Factorial Analysis for Optimisation of Medium Components // *International Journal of Forestry Research* V. 2012 (2012), Article ID 318258, 9 p.

8. Butenko, R.G. *Kul'tura izolirovannyh tkaney i fiziologiya morfogeneza rasteniy* /R.G. Butenko. – M.: Nauka, 1964. – 287 s.

9. Butenko, R.G. *Biologiya kletok vysshih rasteniy in vitro i biotekhnologiya na ih osnove: Uchebnoe posobie* / R.G. Butenko.– M.: MFBK-PRESS, 1999.– 160 s.

10. *Metodicheskie rekomendatsii po ispol'zovaniyu biotekhnologicheskikh metodov v rabote s plodovymi, yagodnymi i dekorativnymi kul'turami* / pod red. E.N. Dzhigadlo. – Orel: GNU VNIISPK. – 2005. – 50 s.

11. Vysotskiy, V.A. Osobennosti klonal'nogo mikrorazmnozheniya nekotoryh form remontantnoy maliny / V.A. Vysotskiy // *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii: sb. nauchnyh trudov VSTISP*.– M., 1996.– T.Z.– S. 90-95.

12. Vysotskiy, V.A. *Biotekhnologicheskie priemy v sovremennom sadovodstve* / V.A. Vysotskiy // *Sadovodstvo i vinogradarstvo*. – 2006. – №2. – S. 2-3.

13. Popov, Yu.G. *Ozdorovlenie i razmnozhenie plodovyh i yagodnyh rasteniy metodom kul'tury meristematicheskikh verhushek: metodicheskie ukazaniya* / Yu.G. Popov, V.A. Vysotskiy. – M.: VASHNIL, 1979. – 29 s.

14. Trushechkin, V.G. *Metodicheskie ukazaniya po tehnologii proizvodstva ozdorovlennogo posadochnogo materiala plodovyh i yagodnyh kul'tur vysshih kategoriy* / V.G. Trushechkin, F.Ya. Polikarpova, V.A. Vysotskiy [i dr.]. – M.: NIZISNP, 1986. – 44 s.

15. Upadyshev, M.T. *Teoreticheskie osnovy i prakticheskie aspekty ozdorovleniya plodovyh i yagodnyh kul'tur ot virusov* / M.T. Upadyshev // *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii*, 2011.– T. 26. – S. 109-118.