

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭТАПОВ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПОДВОЕВ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР

Супрун И.И., канд. биол. наук, Амосова М.А., канд. с.-х. наук, Лободина Е.В.,
Аль-Накиб Е.А., Авакимян А.О., Егорова О.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»
(Краснодар)

Реферат. В результате работы оптимизированы приемы культивирования перспективных клоновых подвоев косточковых культур *in vitro*. Исследования проводили на перспективных подвоях для косточковых культур АИ 1, АИ 11, АИ 70 и ПК СК1. Установлено, что лучшим периодом для введения в культуру *in vitro* всех изучаемых подвоев косточковых культур является 2-3 декада мая. Для поверхностной обработки эксплантов косточковых культур в качестве стерилизаторов можно использовать средство «Белизна» (контроль) 1:3, 5 мин. эффективность обработки – 75-89 %, «ОКА-ТАБ», 0,5 %, 7 мин. – 73-85 %, «Аламинол», 1 %, 5 мин. – 50-78 %. На этапе размножения для подвоев АИ 11 и АИ 70 оптимально использовать также среду DKW с Fe-EDDHA, 100 мг/л (БАП – 1,0 мг/л), на которой образуется в среднем 8,1-8,4 новых побегов/экспл. У подвоя ПК СК 1 и АИ 1 активное размножение проходит на среде MS с Fe-EDDHA (БАП – 1,0 мг/л), в среднем образуется 9-10 побегов/экспл.

Ключевые слова: подвои косточковых культур, этапы размножения, сроки инициации, стерилизация, микроразмножение, ризогенез, адаптация

Summary. As a result of the work, methods of culturing promising clone rootstocks of stone cultures *in vitro* have been optimized. Studies were conducted on promising rootstocks for stone crops AI 1, AI 11, AI 70 and PC SK1. It was found that the best period for introduction into the culture *in vitro* of all studied root culture rootstocks is 2-3 decades of May. For surface treatment of stone crop explants "Belizna" agent (control) 1:3, 5 min with treatment efficiency – 75-89 %, "OKA-TAB," 0.5 %, 7 min. – 73-85 %, "Alaminol," 1%, 5 min. – 50-78 % can be used as sterilizers. At the breeding stage, it is also optimal to use DKW medium with Fe-EDDHA, 100 mg/L (BAP – 1.0 mg/L) for rootstocks AI 11 and AI 70, on which an average of 8.1-8.4 new shoots/expl. are formed. Active reproduction takes place on MS medium with Fe-EDDHA (BAP – 1.0 mg/l) in the rootstocks PC SK 1 and AI 1, on average, 9-10 shoots/expl. are formed.

Key words: rootstocks of stone fruit crops, stages of reproduction, timing of initiation, sterilization, micropropagation, rhizogenesis, adaptation

Введение. Подвои косточковых культур селекции СКФНЦСВВ являются перспективными для использования в Северо-Кавказском регионе, так как они адаптированы к нашим почвенно-климатическим условиям. В коллекции растения находятся в ограниченном количестве, некоторые в единичных экземплярах, поэтому требуется наработка посадочного материала для дальнейшего сортоизучения. Размножение подвоев традиционными методами (укоренение зелеными или одревесневшими черенками) не всегда проходит успешно. Некоторые клоновые подвои трудно укореняются. В этом случае можно использовать метод клонального микроразмножения (один из способов вегетативного размножения растений), когда в контролируемых условиях можно размножить необходимое количество растений. В целом, технология клонального микроразмножения хорошо отработана, но эффективность размножения может быть разной и зависеть от генотипа.

Первый этап клонального микроразмножения растений – введение в культуру *in vitro*, определяет дальнейшую успешность размножения растений. К основным факторам, влияющим на эффективность введения, можно отнести сроки введения, фитосанитарное и физиологическое состояние маточных растений, с которых были отобраны экспланты, их видовые и сортовые особенности, тип экспланта [1-3].

Основными проблемами, возникающими на первом этапе микроразмножения растений, являются бактериальная и грибная контаминация на стадии инициации эксплантата [4-8] и соответственно, важно подобрать тип, концентрацию и экспозицию стерилизующего средства так, чтоб оно нейтрализовало микрофлору и не повредило ткани растений [9-12]. Кроме того, является проблемой потемнение среды, ввиду интенсивного выделения некоторыми эксплантами фенольных соединений, что может привести к их гибели [13]. На последующих этапах успешность размножения определяется минеральным, гормональным составом среды и индивидуальными особенностями генотипов [5, 14].

Целью работы являлась оптимизация методики клонального микроразмножения подвоев косточковых культур с учетом их генотипических особенностей.

Объекты и методы исследований. Исследования проводились на базе лаборатории вирусологии и селекционно-биотехнологической лаборатории ФГБНУ СКФНЦСВВ. Объекты исследований: клоновые подвои косточковых культур АИ 1, АИ 11, АИ 70 (селекция СКФНЦСВВ), ПК СК 1 (совместная селекция СКФНЦСВВ и Ставропольской опытно-селекционной станции).

Стерилизацию растительного материала проводили по схеме: часовая промывка проточной водопроводной водой – 5 минутная стерилизация стерилизующим препаратом по вариантам опыта (0,5 % р-р «ОКА-ТАБ», 1,0 % р-р «Аламинол», р-р «Белизна» в разведении 1:3, 3-х кратная отмывка стерильной водой с экспозицией по 5 минут).

Культивирование эксплантов проводили сначала в стеклянных пенициллинках, на этапе размножения в банках объемом 100 и 200 мл при температуре 24-26 °С и 16-ти часовом освещении с интенсивностью 2500-3000 люкс.

Введение эксплантов в культуру *in vitro* проводили со 2 декады апреля (экспланты отбирались с искусственно пробужденных побегов) по 2 декаду июня (с активно растущих побегов).

Обсуждение результатов. Этап введения эксплантов в культуру *in vitro* включает в себя отбор вводимого материала, стерилизацию и вычленение эксплантов, создание оптимальных условий для регенерации и их развития на среде. В результате исследований установлено, что лучшим периодом для введения в культуру *in vitro* всех изучаемых подвоев косточковых культур является 2-3 декада мая. В этот период проходит активное отрастание побегов. Приживаемость эксплантов в этот период составляет от 70,2 % до 93,1 %. Успешность регенерации во многом зависит от стерилизации материала. Для этого отобранный растительный материал промывают в мыльном растворе и в течение часа под проточной водой. Для поверхностной обработки эксплантов косточковых культур в качестве стерилизаторов можно использовать дезинфицирующие средства различных торговых марок. Так эффективность обработки средством «Белизна» (контроль) 1:3, 5 мин составляла 75-89 %, «ОКА-ТАБ», 0,5 %, 7 мин – 73-85 %, «Аламинол», 1 %, 5 мин – 50-78 %. При обработке эксплантов подвоя АИ 11 во всех вариантах отмечено негативное воздействие, проявляющееся в виде некроза тканей эксплантов от 11 до 29 %. В целом, эффективность обработки варьировала от культуры, периода и условий отбора (рис. 1).

На первом этапе размножения для большинства подвоев состав среды не оказывает сильного влияния на регенерацию эксплантов и для введения в культуру используют среду

Мурасиге-Скуга с добавлением (мг/л): тиамин – 0,1; пиридоксин, никотиновая кислота – по 0,5; глицин – 2; мезоинозит – 100; сахароза – 30000; 6-БАП – 0,3 мг/л, агар-агар – 6700; рН – 5,8. Однако экспланты клонового подвоя АИ 11 лучше развиваются на среде DKW с хелатом железа Fe-EDDHA (100 мг/л), при этом отмечен более интенсивный рост и развитие эксплантов. Отдельные побеги были до 1,5-2 см в длину. Листья имели более интенсивную окраску.

Через 3-4 недели культивирования проводят пересадку развившихся эксплантов на свежую питательную среду.

Целью этапа *мультипликации* является получение наибольшего количества побегов от каждого экспланта путем последовательного субкультивирования их на свежую питательную среду через 3 недели (в зависимости от состояния побегов). В качестве индуктора пролиферации побегов подвоев косточковых культур использовался цитокинин 6-БАП, от концентрации которого зависит скорость размножения и степень пролиферации побегов. Оптимальная концентрация 6-БАП в среде для большинства форм клоновых подвоев соответствует 1,0 мг/л. Превышение концентраций приводит к разрастанию эксплантов с образованием большого количества побегов, часть из которых витрифицирована. Для снижения гормональной нагрузки следует чередовать среду, содержащую БАП, с понижением его концентрации в последующем пассаже до 0,5 мг/л. В пассаже, предшествующем укоренению, можно использовать безгормональную среду, при этом увеличивается количество побегов, пригодных для укоренения на 20-30 %.

Количество субкультивирований (пассажей) клоновых подвоев косточковых культур рекомендуется доводить до 9-10, а начиная с четвертого пассажа можно начинать укоренение побегов. Изменение в темпах роста и развития побегов зависит от концентрации 6-БАП, количества и длительности субкультивирований.

Замена классического хелата железа на Fe-EDDHA оказывает положительное влияние на формирование и развитие побегов.

Оптимальным вариантом сред для микроразмножения подвоя ПК СК 1 и АИ1 является среда MS с добавлением Fe-EDDHA в количестве 100 мг/л (вместо Fe-EDTA) и 6-БАП в количестве 1,0 мг/л, при этом формируется 9-10 новых побегов с одного экспланта. Для подвоев АИ 11, АИ 70, подходят по составу среда MS (БАП-1 мг/л) и среда DKW (БАП – 1 мг/л), при этом также положительное влияние на формирование и развитие побегов оказывает замена классического хелата железа на Fe-EDDHA. У подвоя АИ 11 на среде MS с Fe-EDDHA в среднем формировалось 7 побегов, с классическим Fe-EDTA – 4,9 побегов/экпл., на DKW с Fe-EDDHA - 8,1 шт., с Fe-EDTA – 6,2 шт. У подвоя АИ 70 наибольшее количество побегов образовалось на среде DKW с Fe-EDDHA до 8,4 шт./экспл., с Fe-EDTA – 6,3 шт., на среде MS с Fe-EDDHA было в среднем 5,2 побега/экспл., с Fe-EDTA – 4,5 шт. (рис. 2).

Этап ризогенеза микропобегов – важный этап процесса микроразмножения. Для этого отбираются побеги длиной 1,5-2,0 см. Для укоренения подвоев косточковых культур использовали среду MS, с половинным содержанием макросолей, добавлением Fe-EDDHA (вместо Fe-EDTA) в количестве 100-200 мг/л, полным набором микроэлементов, витаминов: тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота по 0,5 мг/л, мезоинозит – 50 мг/л, сахароза – 20000 мг/л, агар-агар – 6700 мг/л. В качестве индуктора корнеобразования использовали ауксин ИМК (индолилмасляная кислота). У подвоя ПК СК 1 при добавлении в среду ИМК в количестве 1,5-2,0 мг/л, процент корнеобразования составляет 80-100 %, образуется 4,1-7 корней, длиной от 1,6 до 2,9 см. Однако, при этом образуется много не качественных, хрящеватых, ломких корней, что отражается на приживаемости

растений в процессе их адаптации к условиям *ex vitro*. Вместе с тем, хорошее корнеобразование у подвоя ПК СК 1 отмечено в контрольном варианте на данной среде без добавления ИМК. Эффективность корнеобразования составляла 57,1-61,8 %, при этом в среднем формировалось 2,4 корня, длиной от 1,2 до 5,1 см [15].



Рис. 1. Развитие эксплантов подвоя АИ 11 на различных питательных средах на этапе введения



Рис. 2. Микропобеги подвоя АИ 70

На этапе *адаптации* микропобегов отбирались укорененные побеги высотой не менее 2 см, имеющие 2 и более корней длиной не менее 2-3 см. Длинные корни укорачивались до длины 3-4 см. Для адаптации использовали субстрат, состоящий из готового питательного грунта для растений «Агробалт», вермикулита и перлита в соотношении 3:1:1. Адаптацию проводили в микропарниках при температуре +22...+26 °С, освещенности 4,5 тыс. люкс, при фотопериоде 16/8 (день – 16 часов, ночь – 8 часов). Ежедневно проводили подкормку растений. После 4 недель адаптации растения пересаживаются в контейнеры с почвенным субстратом большего объема.

Выводы. В ходе работы определены оптимальные сроки введения в культуру подвоев косточковых культур – 2-3 декада мая, подобраны стерилизаторы с эффективностью обработки на уровне контроля «ОКА-ТАБ», 0,5 %, 7 мин – 73-85 % и «Аламинол», 1 %, 5 мин – 50-78 %. Оптимизированы составы сред для микроразмножения подвоев. Для подвоя АИ 1 и ПК СК 1 оптимально использовать среду MS с добавлением Fe-EDDHA в коли-

честве 100 мг/л и 6-БАП в количестве 1,0 мг/л, для подвоев АИ 11 и АИ 70 можно использовать среды MS и DKW с Fe-EDDHA (100 мг/л) и 6-БАП – 1,0 мг/л. На этапе укоренения подвоев косточковых культур можно использовать среду MS, с половинным содержанием макросолей и добавлением Fe-EDDHA, без индукторов ризогенеза.

Литература

1. Кастрицкая М.С., Змушко А.А., Красинская Т.А. Микроразмножение растений рода *Prunus L.*: инициация и размножение // Плодоводство. РУП «Институт плодоводства». Минск, 2018. Т. 30. С. 258-264.
2. Dorić D., Ognjanov V., Ljubojević M., Barać G., Dulić J., Pranjić A., Dugalić K. Rapid Propagation of Sweet and Sour Cherry Rootstocks // Not Bot Horti Agrobo. 2014. 42 (2). P. 488-494. URL: <https://www.notulaeobotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/9671/7757>
3. Муратова С.А., Янковская М.Б., Шорников Д.Г. и др. Особенности введения в культуру *in vitro* плодовых и ягодных растений // Плодоводство: Научные труды, Самохваловичи, 2005. Т. 17, Ч. 2. С. 182-184.
4. Amiri S., Ashtari S., Babaiy A.H. et al. Control of contamination during micropropagation process of Rootstocks Mariana (*Prunus mariana*) // Annals of Biological Research. 2013. Vol. 4 (3). P. 149-151.
5. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: Учебное пособие. М.: МФБК – ПРЕСС, 1999. 160 с.
6. Teixeira da Silva J.A., Nezami-Alanagh E., Barreal M.E., Kher M.M. et al. Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: A reappraisal of possible causes and solutions // Planta. 2020, 252, 47. URL: <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03449-4>
7. Chinnappan Ravinder Singh. Review on problems and its remedy in plant tissue culture // Asian J. Biol. Sci. 2018. V. 11. P. 165-172. URL: Review on Problems and its Remedy in Plant Tissue Culture (docsdrive.com)
8. Abdalla N., El-Ramady H., Seliem, M.K., El-Mahrouk M.E., Taha N. et al. An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges // Horticulturae. 2022. V. 8. P. 677. URL: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677>
9. Сулейманова С.Д. Микрклональное размножение плодовых культур (обзор) // Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal). 2016. № 11. P. 47-54. Режим доступа: <mikroklonalnoe-razmnozhenie-plodovyh-kultur-obzor.pdf> (Дата обращения: 26.07.2018 г.)
10. Ghasheem, N. AL. *In vitro* effect of various sterilization techniques on peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) explants / N. AL. Ghasheem, F. Stănică, A. G. Peticilă, O. Venat // Scientific Papers. Series B, Horticulture. 2018. Vol. LXII. P.227-234.
11. Кобринец Т.П., Иванова О.С., Поух Е.В. Микрклональное размножение районированных сортов сливы в РУП «Брестская ОСХОС НАН Беларуси» // Селекция и сорторазведение садовых культур. 2017. Т. 4, № 1-2. С. 53-56.
12. Khamurzaev S.M., Vamatov I.M., Butsaeva E.M., Sibiryatkin S.V. The use of the Driver-Kuniyuki nutrient medium for micropropagation of rootstocks of Ic-52 (*Cerasus vulgaris* x *Cerasus fruticose*) and Gizela 6 (*Persica vulgaris* x *Cerasus canescens*) Stone Fruit Crops // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. 2018. Vol. 6(3). P. 623-627. https://www.jebas.org/uploads/206_pdf.pdf 33
13. Баймухаметова Э.А., Кулуев Б.Р. Потемнение растительных тканей при культивировании *in vitro* и способы его предотвращения // Биотехнология. 2020 (2). P. 26-42.
14. 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.
15. Способ получения микрорастений подвоя косточковых культур (ПК СК 1): патент № 2779139 / Супрун И.И., Винтер М.А., Федорович С.В., Лободина Е.В., Авакимян А.О., Аль-Накиб Е.А.; заявл. 02.11.2021; опубл. 01.09.2022.