

УДК 581.085

*О.К. Таварткиладзе, Н.А. Вечернина***Размножение ежевики в культуре *in vitro***

Методы биотехнологии позволяют осуществить ускоренное размножение новых форм, сортов и даже единичных экземпляров растений. Основываясь на моделях органогенеза, выделяют три основные модели микроразмножения растений:

- получение каллуса с последующей индукцией органогенеза или соматического эмбриоидогенеза;
- индукция развития побегов или соматических эмбриоидов непосредственно из ткани экспланта;
- пролиферация пазушных побегов.

Каждая из этих моделей характеризуется различной степенью надежности в отношении сохранения генетической стабильности размножаемых форм, универсальности для определенного круга растений, коэффициента размножения, воспроизводимости результатов.

При клональном микроразмножении предпочтение отдается методам, базирующимся на культивировании верхушек побегов. К культуре верхушек побегов относят экспланты, которые называют либо стеблевыми апексами, либо стеблевыми апикальными меристемами, либо верхушками побегов. Для подавляющего большинства растений эти типы эксплантов более всего отвечают требованию, с одной стороны, получения генетически однородного посадочного материала, а с другой стороны, наличия достаточно высокого коэффициента размножения. Объясняется это тем, что в почках локализуются недифференцированные, генетически однородные меристематические клетки, которые легче вступают на путь органогенеза, чем зрелые дифференцированные клетки других органов. Кроме того, почки представляют собой сформированный рудиментарный побег, хорошо защищены чешуей и легко могут быть подвергнуты процедурам поверхностной стерилизации [1, с. 93; 2, с. 27; 3, с. 137].

В нормальных условиях рост пазушных почек не проявляется, так как их развитие заторможено апикальным доминированием. Торможение роста пазушных почек обусловлено влиянием лидирующего побега. В основе метода размножения путем активации пазушных меристем лежит процесс снятия апикального доминирования. Для достижения интенсивного роста побегов необходимо удалить апекс стебля или добавить в питательную среду цитокинин. Взаимодействие эндогенного ауксина, который участвует в явлении апикального доминирования, с другими фитогормонами, в частности с цитокинином, приостанавливает рост верхушечной почки и стимулирует развитие пазушных почек.

Поскольку каждый вид и даже сорт растений предъявляет свои специфические требования к условиям

культивирования, целью работы явилось изучение влияния регуляторов роста на регенерацию и микроразмножение *in vitro* бесшипой ежевики садовой.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования явилась перспективная форма бесшипой садовой ежевики. Латеральные почки поверхностно стерилизовали в 0,1% растворе сулемы в течение 15 мин, а затем четырежды промывали в стерильной дистиллированной воде. В качестве первичных эксплантов были использованы меристемы (0,5–1,0 мм), выделенные из них в стерильных условиях ламинар-бокса с использованием стереомикроскопа МБС-9. Меристемы помещали на основную питательную среду Гамборга В₅, дополненную, в зависимости от цели эксперимента, одним из следующих регуляторов роста: цитокинином 6-бензмиламинопурином (БАП), ауксинами – α -нафтилуксусной кислотой (НУК) или β -индолилмасляной кислотой (ИМК).

Культивирование проводили при 24±1 °С, в условиях фотопериода 16/8 часов свет/темнота. Период субкультивирования составлял 25–30 суток. В конце пассажа учитывали высоту побегов, мм, количество регенерировавших почек, шт., наличие каллуса на базальной части побегов, + / –, общее количество корней, шт., и их длину, см, количество укоренившихся растений, шт.

Результаты исследований и их обсуждение. На этапе введения в асептическую культуру эксплантов указанный режим поверхностной стерилизации оказался приемлемым, что позволило ввести в культуру *in vitro* **85% растительного материала: из 20 шт.** почек 17 шт. оказались неинфицированными и жизнеспособными. В последующем, на этапе собственно размножения бесшипой формы ежевики, изучено влияние различных концентраций БАП. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Во многих экспериментах продемонстрирована высокая эффективность БАП в отношении снятия апикального доминирования. Примером могут служить растения винограда [4, с. 11], ряд клоновых подвоев яблонь [5, с. 346], черной и красной смородины [6, с. 22], сливы [7, с. 74]. Как видно из представленных в таблице данных, при культивировании пазушных почек ежевики на среде В₅, содержащей невысокие концентрации БАП (0,5 мкМ), регенерировали 1–2 побега, тогда как увеличение концентрации цитокинина приводило к регенерации большого числа почек, но они, как правило, не развивались в побеги по причине явления апикального доминирования. Вероятно, для ежевики концентрации цитокинина (5–10 мкМ) являются высокими. Поэтому на вто-

Таблица 1

Влияние концентрации БАП на рост и развитие побегов бесшипой ежевики в культуре пазушных почек *in vitro*, n = 10

Показатели	БАП, мкМ				
	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
Число почек, шт./экспл.	1.2±0.2	5 ±0.8	8.2±0.5	11.2±1.2	15.4±1.5
Высота побегов, мм	2.2±0.1	1.5±0.5	0.7± 0.5	0.3	0.2
Каллус, +/-	–	–	–	+	+

Таблица 2

Влияние ауксинов на укоренение побегов бесшипой ежевики *in vitro*, n=10

Регуляторы роста	Концентрация, мкМ	Укоренение, %	Число корней, шт./экспл.	Длина корней, см	Каллус, +/-
НУК	0.5	90	2.2±0.5	1.2 ±0.5	+
	2.0	90	2.1±0.6	3.1±0.8	+
	5.0	60	1.4±0.5	1.5±0.5	+
ИМК	0.5	80	2.5±1.2	2.1±1.2	–
	2.0	100	4.2±1.1	5.6±1.4	–
	5.0	70	2.2±0.8	3.0±1.1	+

ром этапе микроразмножения применили прием чередования питательных сред с высокой и низкой концентрацией БАП. Использовать БАП выше 5 мкМ оказалось нецелесообразно, так как, несмотря на то, что коэффициент размножения на этой среде самый высокий (15), почки были гипергидратированы, и даже при переносе на среду с пониженной концентрацией цитокинина большинство из них не развивались в нормальные побеги. Кроме того, при относительно высокой концентрации цитокинина происходило формирование каллусной массы на базальной части.

Побеги, развившиеся на среде с 0,5 мкМ БАП, использовали на третьем этапе микроразмножения – этапе укоренения. Для этого их пересаживали на среду с редуцированным вдвое минеральным составом и различными концентрациями одного из ауксинов: ИМК или НУК (0,5, 2,0 или 5 мкМ) (табл. 2). Нами установлено, что лучшим стимулятором ризогенеза для побегов ежевики явилась ИМК в концентрации 2 мкМ. В этом варианте ризогенез не сопровождался каллусогенезом базальных частей побега, и у каждого побега регенерировало по 4–5 корней. Использование другого стимулятора ризогенеза – НУК приводило к развитию каллуса. Такой результат получали даже в том случае, если НУК была добавлена в состав

питательной среды в относительно небольшой концентрации (0,5 мкМ). Кроме того, регенерировавшие корни имели ненормальную морфологию (широкие, плоские), были ломкими.

От растений-регенерантов были взяты одноузловые черенки (при этом побег с 2–3 узлами и корневой системой использовался для высадки в почвенный субстрат) и помещены на среду для регенерации корней с 2 мкМ ИМК. Так же как и побеги, они укоренялись. Такой способ размножения (микрочеренкование) при использовании одной только среды (для укоренения) позволил получить коэффициент размножения 4–5 за один пассаж. Этот подход также может быть использован для микроразмножения ежевики.

Заключение. Изучена регенерационная способность пазушных почек бесшипой ежевики и установлено, что на этапе собственно размножения наиболее целесообразно использование невысоких концентраций БАП (0,5–1 мкМ). Для укоренения полученных побегов в редуцированную вдвое по минеральному составу основную питательную среду необходимо вводить 2 мкМ ИМК. При продолжительном процессе микроразмножения для ежевики можно применять микрочеренкование побегов. Культивирование микрочеренков с 2–3 пазушными почками необходимо проводить на среде с 2 мкМ ИМК.

Библиографический список

1. Bonga, J.M. Applications of tissue culture in forestry / J.M. Bonga // Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture, Ed. by Reinert J., Bajaj Y.P.S. – 1977. – Pt. 5.
2. Туровская, Н.И. Микроразмножение малины / Н.И. Туровская, О.В. Стрыгина // Садоводство и виноградарство. – 1990. – №8.
3. Катаева, Н.В. Клональное размножение растений в культуре тканей / Н.В. Катаева, В.А. Аветисов // Культура клеток растений. – М., 1981.
4. Zlenko, V.A. In vitro propagation of grapevine. Part I. Cultivation of shoot apices and in vitro proliferation of axillary grapevine buds / V.A. Zlenko, L.P. Troshin, I.V. Kotikov // Vitis: Viticult. And Enol. Absir. – 1999. – 38. – №3.

5. Свитайло, А.М. Клональное микроразмножение подвоев и сортов плодовых культур / А.М. Свитайло, П.Е. Бондаренко, Н.С. Шевчук // Биология культивируемых клеток и биотехнология. – Новосибирск, 1988. – Т. 2.

6. Высоцкий, В.А. Микроразмножение здорового посадочного материала ягодных культур / В.А. Высоцкий,

З.Т. Тарашвили // Садоводство. – 1982. – №2.

7. Shibli, R.A. In vitro multiplication of bitter almond (*Prunus amygdalus*) from North. Jordan / R.A. Shibli, A.C. Jaradat, M.M. Ajloni, S. Ajjanabi // In vitro Cell. and Dev. Biol. Anim. –1996. – 32. – №3. – Pt. 2.