

*Д.С. Кульханова, Т.В. Плаксина, И.Д. Бородулина*

## **Размножение *in vitro* ремонтантных сортов малины**

*D.S. Kulkhanova, T.V. Plaksina, I.D. Borodulina*

## **Remontant Raspberry Varieties' Propagation in Vitro**

Изучались особенности клонального микроразмножения ремонтантных сортов малины. В результате проведенных исследований определены оптимальные концентрации и сочетания гормонов роста, обеспечивающие интенсивную пролиферацию адвентивных побегов и развитие морфологических признаков.

**Ключевые слова:** ремонтантная малина, размножение *in vitro*, регенеранты, культура тканей.

We study the characteristics of clone micro-propagation of remontant raspberry varieties. As a result the optimal concentrations and combinations of growth regulators providing intensive proliferation of adventitious shoots and development of morphological features are determined.

**Key words:** remontant raspberries, propagation *in vitro*, regenerant, tissue culture.

Малина – одна из наиболее ценных ягодных культур. Ее плоды пользуются большим спросом у населения, так как обладают уникальными питательными и лечебными свойствами.

Перспективным направлением является создание сортов малины ремонтантного типа, формирующих основной урожай на побегах текущего года во второй половине лета – начале осени, генетический потенциал и необычный способ возделывания которых обеспечивают максимальную механизацию по уходу за насаждениями, включая уборку урожая. Выращивание ремонтантных сортов малины, в дополнение к сортам обычного типа (неремонтантным), позволяет продлить период потребления свежих ягод на 1,5–2 месяца. При подборе сортов разного срока созревания можно создать непрерывный конвейер поступления свежих ягод малины с конца июня до октября [1, с. 13; 2, с. 49].

Однако ремонтантные формы малины сложно межвидового происхождения отличаются низкими коэффициентами размножения, а отдельные генотипы совсем не образуют корневой поросли [3, с. 2]. Данная биологическая особенность ремонтантной малины увеличивает период полевого размножения и, следовательно, значительно удлиняет процесс перехода элитных форм к сортоиспытанию. Поэтому для ускорения селекционного процесса актуально использование метода клонального микроразмножения растений.

По сравнению с традиционными способами размножения, применение биотехнологических приемов позволяет в короткие сроки получить в большом количестве оздоровленный посадочный материал, генетически идентичный материнскому растению, работать в лабораторных условиях круглый год и планировать выпуск растений к определенному сроку,

длительно сохранять растительный материал в условиях *in vitro*, ускорять селекционный процесс [4, с. 21; 5, с. 66; 6, с. 50].

Цель исследования – изучение морфогенетического потенциала ремонтантных сортов малины в культуре *in vitro*.

**Объекты и методы исследования.** Объектом для исследования служили сорта ремонтантной малины Атлант и Шапка Мономаха. Данные сорта были выбраны вследствие их высокой урожайности, крупноплодности, а также возможности использования в приусадебном хозяйстве.

Растения-регенеранты помещали на агаризированную питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга с увеличенной вдвое концентрацией хелата железа, дополненной различными регуляторами роста. Для индукции морфогенеза использовали цитокинины: 6-бензиламинопурин (6-БАП), 2-изопентениладенин (2-ип), тидиазурон (TDZ); ауксины: индолил-3-масляная кислота (ИМК), индолил-3-уксусная кислота (ИУК), 1-нафтилуксусная кислота (НУК); гиббереллины: гибберелловая кислота (ГК).

Культивирование проводили при 24±1 °С, в условиях фотопериода 16/8 часов. Длительность пассажа составляла 25–30 дней. Фиксировали следующие показания: количество побегов, шт./экспл.; высота побега, мм; количество листьев на побеге, шт./экспл.; наличие каллуса +/–. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2007.

Исследования выполнены в 2010–2012 гг. в лаборатории биотехнологии и цитологии ГНУ НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко Россельхозакадемии.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Опытным путем нами было установлено, что для культивирования растений различных сортов может

подходить несколько питательных сред с разным содержанием фитогормонов.

В результате проведенных экспериментов отобраны варианты сред, на которых наблюдалось активное побегообразование. Существенным моментом, обеспечивающим активную пролиферацию микропобегов *in vitro*, является правильный выбор цитокинина и его концентрации [7, с. 641]. Из регуляторов роста

цитокининового ряда наиболее эффективными оказались среды с 6-БАП и TDZ как для сорта Атланта, так и для сорта Шапка Мономаха.

Изучая влияние 6-БАП на побегообразование ремонтантной малины, было отмечено, что наибольший коэффициент размножения ( $2,3 \pm 0,2$  шт./экспл.) для сорта Атлант обеспечивала среда МС с 1,0 мкМ этого цитокинина (рис. 1).

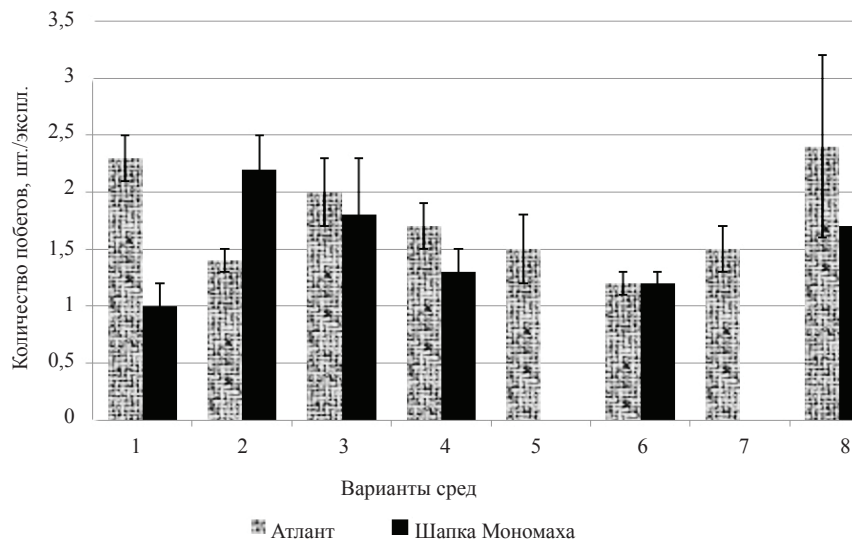


Рис. 1. Влияние различных цитокининов на количество побегов ремонтантной малины

Условные обозначения: 1 – 6-БАП 1,0 мкМ; 2 – 6-БАП 2,0 мкМ; 3 – 6-БАП 5,0 мкМ; 4 – 6-БАП 10,0 мкМ; 5 – 2-ип 2,0 мкМ; 6 – 2-ип 5,0 мкМ; 7 – TDZ 0,5 мкМ; 8 – TDZ 1,0 мкМ.

При этом высота побега составляла  $14,0 \pm 0,7$  мм; количество листьев на побеге –  $8,0 \pm 0,4$  шт./экспл. Для сорта Шапка Мономаха оптимальна среда МС с 5,0 мкМ 6-БАП. На этой среде растения имели максимальную высоту ( $18,8 \pm 3,2$  мм) и количество листьев ( $13,0 \pm 1,3$  шт./

экспл.), но при этом невысокий коэффициент размножения –  $1,8 \pm 0,5$  шт./экспл. Учет высоты побега в дальнейшем дает возможность использовать при размножении микрочеренки, что влияет на успешность адаптации растений-регенерантов к нестерильным условиям (рис. 2).

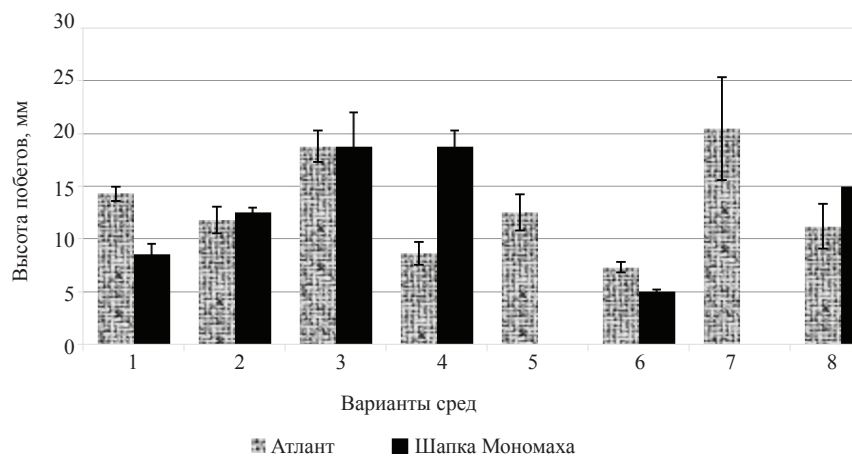


Рис. 2. Влияние различных цитокининов на высоту побега ремонтантной малины

Условные обозначения: 1 – 6-БАП 1,0 мкМ; 2 – 6-БАП 2,0 мкМ; 3 – 6-БАП 5,0 мкМ; 4 – 6-БАП 10,0 мкМ; 5 – 2-ип 2,0 мкМ; 6 – 2-ип 5,0 мкМ; 7 – TDZ 0,5 мкМ; 8 – TDZ 1,0 мкМ.

При использовании в качестве цитокинина TDZ наблюдались практически такие же коэффициенты размножения, как и при использовании 6-БАП:  $2,4 \pm 0,8$  побега на экспл. для сорта Атлант и  $1,7 \pm 0,2$  шт./экспл. – для сорта Шапка Мономаха. Однако при этом отмечалось каллусообразование у основания побега, что нежелательно при микро-размножении, так как затрудняется поступление питательных веществ в растение.

Внесение в питательную среду 2-ip в качестве активатора побегообразования сопровождалось низким коэффициентом размножения для обоих сортов ремонтантной малины.

Изучение совместного влияния разных регуляторов роста (цитокининов, ауксинов и гиббереллинов) на морфогенез ремонтантной малины показало,

что наибольший эффект для сорта Атлант обеспечивали комбинации 1,0 мкМ 6-БАП + 0,1 мкМ НУК, а также среда с 5,0 мкМ 6-БАП + 0,25 мкМ ИМК (рис. 3). При этом на обеих средах микрорастения имели оптимальную высоту ( $13,7 \pm 1,0$  и  $15,3 \pm 0,5$  мм соответственно) и достаточное количество листьев ( $11,6 \pm 0,7$  и  $9,0 \pm 1,4$  шт./экспл. соответственно), но на первой среде каллус образовывался, а на второй отсутствовал. Для сорта Шапка Мономаха наилучших результатов удалось достичь в варианте с 1,0 мкМ 2-ip + 0,1 мкМ НУК. Регенеранты были достаточно высокими ( $17,0 \pm 0,8$  мм) и хорошо облиственными ( $12,2 \pm 0,8$  шт./экспл.). Внесение в питательную среду МС цитокининов, ауксинов и гиббереллинов в различных концентрациях несколько снижало коэффициенты размножения изучаемых сортов малины.

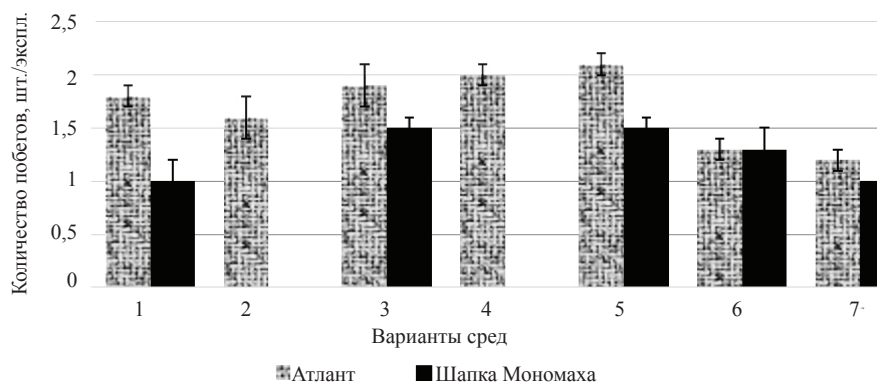


Рис. 3. Влияние регуляторов роста на количество побегов ремонтантной малины

Условные обозначения: 1 – 6-БАП 1,0 мкМ + НУК 0,1 мкМ; 2 – 6-БАП 5,0 мкМ + НУК 0,25 мкМ; 3 – 6-БАП 5,0 мкМ + ИМК 2,5 мкМ; 4 – 6-БАП 5,0 мкМ + ИМК 0,5 мкМ + ГК 1,5 мкМ; 5 – 6-БАП 5,0 мкМ + ИМК 0,25 мкМ; 6 – 2-ip 1,0 мкМ + НУК 0,1 мкМ; 7 – 2-ip 5,0 мкМ + ИМК 2,5 мкМ.

Экспериментально установлено, что предпочтительнее использовать 6-БАП, так как этот цитокинин обеспечивает более высокий коэффициент размножения, хороший рост и развитие микрорастений, а также отсутствие каллуса (рис. 4)..



Рис. 4. Растение-регенерант ремонтантной малины сорта Атлант на питательной среде, содержащей 1,0 мкМ 6-БАП

Следует добавить, что при снижении концентрации 6-БАП (с 10,0 до 5,0 мкМ) увеличивается количество побегов длиной более 10,0 мм. При этом отмечено, что высокие концентрации 6-БАП (10,0 мкМ) негативно влияют на коэффициент размножения.

Сравнительный анализ сортов показал, что более высоким морфогенетическим потенциалом обладает сорт Атлант, по сравнению с Шапкой Мономаха. Этот сорт легче размножался в условиях *in vitro*: у него более высокий коэффициент размножения, высота и облиственность побегов.

Таким образом, изучены особенности клонального микро-размножения ремонтантных сортов малины и установлено, что на этапе собственно размножения целесообразно использовать невысокие концентрации цитокининов: для сорта Атлант – 1,0 мкМ 6-БАП (коэффициент размножения  $2,3 \pm 0,2$  шт./экспл.), для сорта Шапка Мономаха – 5,0 мкМ 6-БАП (коэффициент размножения  $1,8 \pm 0,5$  шт./экспл.). При культивировании малины на данных средах растения-регенеранты имели развитый листовой аппарат и достаточную высоту побега.

### Библиографический список

1. Евдокименко С.Н. Ремонтантная малина – перспективное направление в селекции // Агро XXI. – 2009. – №10–12.
2. Казаков И.В., Евдокименко С.Н. Достижения в селекции ремонтантной малины на основе межвидовой гибридизации // Вестник Южно-Уральского государственного университета. – 2009. – №1.
3. Озеровский А.В. Микроклональное размножение селекционных форм ремонтантной малины с использованием новых регуляторов роста: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – Брянск, 2007.
4. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М., 1999.
5. Ветчинкина Е.М., Малаева Е.В., Мамаева Н.А., Зинина Ю.М., Коновалова Л.Н., Коротков О.И., Молканова О.И. Использование биотехнологических методов для сохранения генофонда редких и ценных видов растений // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: тез. докл. IX Междунар. конф. (8–12 сентября 2008 г., Звенигород). – М., 2008.
6. Sedlak J., Paprstein F., Bilavcik A., Zamenik J. Long term storage of vegetatively propagated fruit species // Vyzkumny a slechtitelskyustavovocnarsky. – Holovousy, 2005. – №19.
7. Шорников Д.Г., Брюхина С.А., Муратова С.А., Янковская М.Б., Папихин Р.В. Оптимизация условий культивирования *in vitro* ягодных и декоративных культур // Вестник ТГУ. – 2010. – Т. 15, вып. 2.