

РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ МИКРОЧЕРЕНКОВАНИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ЕЖЕВИКИ В УСЛОВИЯХ *EX VITRO*

О. А. ГАШЕНКО, Н. В. КУХАРЧИК

РУП «Институт плодоводства»,
ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: belhort@belsad.by

АННОТАЦИЯ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2019–2020 гг. в лабораторных условиях. Цель исследования заключалась в оценке результативности микрочеренкования сортов ежевики в условиях *ex vitro*.

Проведенные исследования по черенкованию укоренившихся *ex vitro* микропобегов можно использовать для увеличения выхода товарной продукции сортов ежевики. В ходе микрочеренкования в условиях *ex vitro* микропобегов сортов ежевики получен 100%-ный выход укоренившихся черенков как на субстрате агроперлит, так и на мхе *Sphagnum L.* с поверхностным слоем торфа «Двина». По комплексу морфометрических показателей целесообразнее использовать субстрат, состоящий из мха *Sphagnum L.* с поверхностным слоем торфа «Двина».

Установлено достоверное влияние с высоким уровнем значимости ($p < 0,001$) как сортовых особенностей, так и субстрата и двух факторов вместе на длину побегов, количество междоузлий и длину корней сортов ежевики. Количество корней зависело только от вида субстрата ($p < 0,001$).

Ключевые слова: ежевика, *Rubus L.*, микрочеренкование, укоренение *ex vitro*, агроперлит, торф, мох *Sphagnum L.*, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Ежевика – представитель рода *Rubus L.* семейства розовых. Плоды ежевики обладают высокими вкусовыми качествами, используются как в свежем, так и в переработанном виде. По биохимическому составу ягоды ежевики близки к малине, а по содержанию биофлавоноидов и пектина даже превосходят их. Урожайность ежевики намного выше, чем малины [1]. В связи с возрастающим интересом населения к ежевике стала актуальной проблема ускоренного размножения ценных форм и сортов этой культуры. Клональное микроразмножение является наиболее эффективным способом получения оздоровленного чистосортного посадочного материала ягодных культур [2–9].

Ответственными и наиболее уязвимыми этапами в технологии клонального микроразмножения плодовых и ягодных культур являются ризогенез и адаптация к нестерильным условиям. В процессе размножения ягодных растений в культуре *in vitro* традиционно присутствуют стадия ризогенеза в культуре *in vitro* и последующая адаптация *ex vitro*. Корни, образованные в культуре *in vitro*, анатомически отличаются от корней *ex vitro*, характеризуются отсутствием корневых волосков, а также корней второго порядка. По этой причине адаптируемые регенеранты имеют небольшую площадь питания и слабую поглотительную способность [10–14].

Разработка способа укоренения микрочеренков непосредственно в субстрате, минуя стадию укоренения в пробирке, позволяющего значительно упростить и удешевить технологию культивирования садовых культур *in vitro* за счет совмещения этапов ризогенеза и адаптации, заслуживает особого внимания. При этом происходит не только корнеобразование, но и адаптация микрорастений к нестерильным условиям [3, 15–20].

Основываясь на полученных ранее результатах исследований по укоренению в условиях *ex vitro* микрочеренков ягодных культур, применение таких методов, как микроразмножение и микрочеренкование, является перспективным направлением. В этом случае весь этап микроразмножения сокращается на 1,5 мес. и позволяет увеличить выход оздоровленного посадочного материала в нужном количестве и достаточно быстро, что важно при массовом размножении растений в производстве [21–25].

Целью исследований явилась оценка результативности микрочеренкования сортов ежевики в условиях *ex vitro*.

ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2019–2020 гг. в лабораторных условиях.

Материалом для исследования служили микропобеги сортов ежевики: Стэфан, Natchez, Chester, Thornfree.

В ходе микрочеренкования в условиях *ex vitro* в качестве черенков использовали верхушки микропобегов, укоренившихся *ex vitro* [25]. При черенковании срез делали над почкой на расстоянии 1,5–2,0 см от субстрата.

Для черенкования *ex vitro* микропобегов ежевики использовали мини-парники 450×200×70 мм (расстояние между рядами – 15–20 мм, в ряду – 15–20 мм), мох *Sphagnum* L., торф «Двина», агроперлит. Агроперлит – это вспученный перлит размером фракций 1–5 мм, его получают путем термической обработки вулканических материалов. Это легкий и пористый материал белого цвета, разделяющийся по фракциям.

Мох *Sphagnum* L. после сбора хранился в высушенном виде. По данным производителя, торфяной питательный грунт «Двина» представляет собой верховой торф, насыщенный следующими элементами: азот (N) – 170–270 мг/100 г, фосфор (P₂O₅) – 110–190 мг/100 г, калий (K₂O) – 200–340 мг/100 г; pH 5,5–6,5.

Субстраты, используемые при черенковании сортов ежевики:

агроперлит;

мох *Sphagnum* L. с поверхностным слоем (0,5 см) торфа «Двина».

Длительность периода укоренения – 8 нед.

Результативность черенкования *ex vitro* оценивали по следующим показателям: доля укоренившихся *ex vitro* микропобегов, %; длина побега, см; количество междоузлий, шт.; количество корней, шт.; средняя длина корней, см.

Условия адаптации: освещение – 2,5–3,0 тыс. люкс, температура – +20...+22 °С, фотопериод – 16/8 ч.

Опыты проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку выполняли в программе Statistica 10, используя ANOVA, двухфакторный дисперсионный анализ, критерий Дункана ($p < 0,05$) для сравнения средних значений ($n = 3$). В таблице данные приведены в виде «среднее значение ± стандартная ошибка». Построение графиков проводили в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе микрочеренкования микропобегов сортов ежевики в условиях *ex vitro* получен 100%-ный выход укоренившихся черенков как на субстрате агроперлит, так и на мхе *Sphagnum* L. с поверхностным слоем торфа «Двина» (рис. 1).

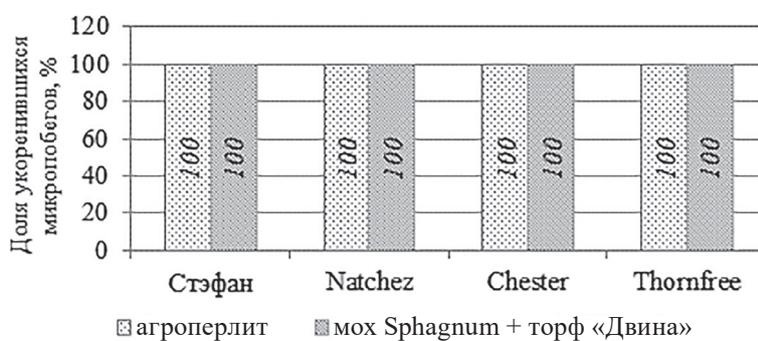


Рис. 1. Результативность черенкования микропобегов сортов ежевики в условиях *ex vitro*

В результате проведенного двухфакторного дисперсионного анализа установлено влияние с высоким уровнем значимости ($p < 0,001$) как сортовых особенностей, так и субстрата и двух факторов вместе ($p < 0,001$) на длину побегов, количество междоузлий и длину корней сортов ежевики. Количество корней зависело только от вида субстрата ($p < 0,001$).

Несмотря на то, что количество укоренившихся черенков было 100%-ным для двух субстратов, отмечались различия в морфологическом развитии растений (длина побега, количество междоузлий, количество корней, длина корней).

После 8 нед. укоренения микропобегов *ex vitro* развитие надземной части (длина побега и количество междоузлий) растений изучаемых сортов ежевики было лучше на субстрате с использованием мха *Sphagnum L.* со слоем торфа «Двина» (таблица).

Морфологические показатели развития микропобегов сортов ежевики при черенковании в условиях *ex vitro* в зависимости от субстрата (среднее значение \pm стандартная ошибка)

Субстрат	Сорт	Длина побега, см	Количество междоузлий, шт.	Количество корней, шт.	Длина корней, см
Агроперлит	Стэфан	3,60 \pm 0,15 ^a	3,43 \pm 0,03 ^a	7,80 \pm 0,25 ^a	8,07 \pm 0,17 ^b
	Natchez	3,50 \pm 0,15 ^a	3,50 \pm 0,10 ^a	7,73 \pm 0,43 ^a	8,20 \pm 0,12 ^b
	Chester	3,80 \pm 0,12 ^a	3,60 \pm 0,06 ^a	8,57 \pm 0,33 ^a	5,47 \pm 0,49 ^a
	Thornfree	4,00 \pm 0,12 ^a	3,57 \pm 0,07 ^a	7,37 \pm 0,24 ^a	8,20 \pm 0,44 ^b
Мох <i>Sphagnum L.</i> + слой торфа «Двина»	Стэфан	6,70 \pm 0,52 ^c	6,57 \pm 0,12 ^b	13,63 \pm 0,24 ^b	5,37 \pm 0,30 ^{ad}
	Natchez	7,60 \pm 0,20 ^d	6,30 \pm 0,32 ^b	13,53 \pm 0,73 ^b	5,50 \pm 0,12 ^a
	Chester	9,53 \pm 0,38 ^b	7,83 \pm 0,15 ^c	14,77 \pm 1,07 ^b	4,57 \pm 0,18 ^{cd}
	Thornfree	9,60 \pm 0,42 ^b	7,57 \pm 0,22 ^c	13,83 \pm 0,72 ^b	4,33 \pm 0,12 ^c

Примечание. Данные с одинаковыми буквами по столбцам статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана).



Рис. 2. Результативность черенкования в условиях *ex vitro* микропобегов сорта ежевики Thornfree на субстратах мох *Sphagnum L.* с поверхностным слоем торфа «Двина» и агроперлит

Лучшими результатами как по длине побегов (9,53 \pm 0,38 и 9,60 \pm 0,42 см), так и по количеству междоузлий (7,83 \pm 0,15 и 7,57 \pm 0,22 шт.) на данном субстрате были получены для сортов Chester и Thornfree соответственно. Для сортов Стэфан и Natchez длина побега составила 6,70 \pm 0,52 и 7,60 \pm 0,20 см, а количество междоузлий – 6,57 \pm 0,12 и 6,30 \pm 0,32 шт. соответственно. Данные показатели изучаемых сортов на субстрате агроперлит статистически значимо не отличались между собой (таблица, рис. 2).

Получены хорошие результаты по количеству корней всех сортов ежевики (не менее 13,53 \pm 0,73 шт.) на субстрате с использованием мха *Sphagnum L.* со слоем торфа «Двина». Однако длина корней укоренившихся *ex vitro* микропобегов на данном субстрате составила от 4,33 \pm 0,12 до 5,50 \pm 0,12 см (таблица).

Следует отметить, что субстрат агроперлит оказал положительное влияние на длину корней микропобегов. На данном субстрате длина корней составила 8,07 \pm 0,17 см для сорта Стэфан, 8,20 \pm 0,12 см –

для сорта Natchez и 8,20 \pm 0,44 см – для сорта Thornfree. Для сорта Chester длина корней составила лишь 5,47 \pm 0,49 см (рис. 3).

Таким образом, по комплексу морфометрических показателей лучшим субстратом для укоренения *ex vitro* микропобегов сортов ежевики является мох *Sphagnum L.* с поверхностным слоем торфа «Двина».



Рис. 3. Укоренившиеся *ex vitro* микропобеги сорта ежевики Natchez на субстратах:
 а – мох *Sphagnum* L. с поверхностным слоем торфа «Двина»; б – агроперлит

ВЫВОДЫ

Проведенные исследования по черенкованию укоренившихся *ex vitro* микропобегов можно использовать для увеличения выхода товарной продукции сортов ежевики. Несмотря на 100%-ный выход укоренившихся *ex vitro* микропобегов как на субстрате агроперлит, так и на мхе *Sphagnum* L. с поверхностным слоем торфа «Двина», по комплексу морфометрических показателей целесообразнее использовать субстрат, состоящий из мха *Sphagnum* L. с поверхностным слоем торфа «Двина».

Установлено достоверное влияние с высоким уровнем значимости ($p < 0,001$) как сортовых особенностей, так и субстрата и двух факторов вместе на длину побегов, количество междоузлий и длину корней сортов ежевики. Количество корней зависело только от вида субстрата ($p < 0,001$).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- Кулагина, В. Л. Малораспространенные плодовые культуры для средней полосы России : учеб.-метод. пособие / В. Л. Кулагина, С. Н. Евдокименко. – Брянск : Брян. ГСХА, 2012. – 52 с.
- Высоцкий, В. А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве / В. А. Высоцкий // Плодоводство и ягодоводство России : сб. науч. работ / ВСТИСП ; редкол.: И. М. Куликов (гл. ред.) [и др.]. – М., 2011. – Т. XXVI. – С. 2–10.
- Клоконос, Н. П. Усовершенствование способов получения растений ежевики из изолированных меристематических верхушек / Н. П. Клоконос // Плодоводство и ягодоводство России : сб. науч. работ / ВСТИСП ; редкол.: В. И. Кашин [и др.]. – М., 2004. – Т. XI. – С. 195–199.
- Кузнецова, И. Б. Влияние росторегулирующих веществ на процесс побегообразования при клональном микроразмножении ежевики / И. Б. Кузнецова, С. С. Макаров, В. М. Дрозд // Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе : сб. ст. 69-й Междунар. науч.-практ. конф., Караваево, 17 янв. 2018 г. / Костром. гос. с.-х. акад. ; редкол.: Ю. В. Панкратова, Н. Ю. Парамонова. – Караваево : ГСХА, 2018. – Т. 1 : Агробизнес. – С. 69–72.
- Высоцкий, В. А. Использование препаратов Эмистим и Экост 1/3 в технологиях микроклонального размножения ежевики / В. А. Высоцкий, О. В. Карпова, М. М. Янина // Аграр. Россия. – 1999. – № 1 (2). – С. 44–46.
- Соловых, Н. В. Эффективность использования различных цитокининов для клонального размножения *in vitro* растений рода *Rubus* / Н. В. Соловых // Плодоводство и ягодоводство России : сб. науч. работ / ВСТИСП ; редкол.: И. М. Куликов (гл. ред.) [и др.]. – М., 2013. – Т. XXXVII. – С. 316–321.
- Таварткиладзе, О. К. Размножение ежевики в культуре *in vitro* / О. К. Таварткиладзе, Н. А. Вечернина // Изв. Алтай. гос. ун-та. Биолог. науки. – 2007. – № 3 (55). – С. 28–30.
- Макаров, С. С. Влияние регуляторов роста при клональном микроразмножении ежевики [Электронный ресурс] / С. С. Макаров, И. Б. Кузнецова // Лесохозяйственная информация : электрон. сетевой журн. – 2017. – № 4. – Режим доступа: http://lhi.vniilm.ru/PDF/2017/4/LHI_2017_04-05-Makarov.pdf. – Дата доступа: 17.02.2020.
- Ташматова, Л. В. Особенности клонального микроразмножения ежевики с различной формой роста / Л. В. Ташматова, Л. А. Грюнер, О. В. Мацнева // Соврем. садоводство. – 2014. – № 4 (12). – С. 60–63.
- Vegvari, G. Further information to acclimatization of “*in vitro*” / G. Vegvari, J. Vertesy // Int. J. Hort. Sci. – 1999. – Vol. 5. – P. 54–58.

11. Корнацкий, С. А. Комплекс факторов, влияющих на жизнеспособность, рост и развитие микрорастений после культуры *in vitro* / С. А. Корнацкий // Плодоводство и ягодоводство России : сб. науч. работ / ВСТИСП ; редкол.: В. И. Кашин [и др.]. – М., 1999. – С. 64–68.
12. Высоцкий, В. А. Выращивание посадочного материала *in vitro* в производственных условиях / В. А. Высоцкий, А. А. Шипунова // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур : материалы науч.-практ. конф., Москва, 20–22 нояб. 2001 г. / Рос. акад. с.-х. наук., Всерос. селекц.-технол. ин-т садоводства и питомниководства. – М., 2001. – С. 75–76.
13. Размножение плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro* / Н. В. Кухарчик [и др.] ; под общ. ред. Н. В. Кухарчик. – Минск : Беларус. навука, 2016. – 208 с.
14. Батыгина, Т. В. Размножение растений / Т. В. Батыгина, В. Е. Васильева. – СПб. : Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002. – С. 10.
15. Пронина, И. Н. Особенности регенерации сортов малины и ежевики *in vitro* / И. Н. Пронина, О. В. Матушкина // Плодоводство и ягодоводство России : сб. науч. работ / ВСТИСП ; редкол.: В. И. Кашин [и др.]. – М., 2009. – Т. XXII, ч. 2. – С. 206–210.
16. Пронина, И. Н. Ризогенез плодовых и ягодных культур *ex vitro* / И. Н. Пронина, О. В. Матушкина // Достижения науки и инновации в садоводстве : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 75-летию В. А. Потапова. – Мичуринск : Изд-во МичГАУ, 2009. – С. 127–129.
17. Сквородников, Д. Н. Адаптация полученных *in vitro* растений малины к нестерильным условиям / Д. Н. Сквородников, И. А. Райков, Д. Н. Челяев // Вестн. ОрелГАУ. – 2012. – № 2 (35). – С. 70–72.
18. Ярмоленко, Л. В. Особенности ризогенеза сортов малины *ex vitro* / Л. В. Ярмоленко, О. В. Матушкина, И. Н. Пронина // Плодоводство и ягодоводство России : сб. науч. работ / ВСТИСП ; редкол.: И. М. Куликов (гл. ред.) [и др.]. – М., 2017. – Т. XXXXVIII. – С. 308–311.
19. Иванова-Ханина, Л. В. Адаптация растений-регенерантов ежевики к условиям *ex vitro* / Л. В. Иванова-Ханина // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – Симферополь, 2019. – Т. 5 (71), № 1. – С. 30–39.
20. Викулина, А. Н. Применение препарата Гидрогель на этапах адаптации и доращивания *ex vitro* растений рода *Rubus* L. / А. Н. Викулина, С. В. Акимова, В. В. Киркач // Плодоводство и ягодоводство России : сб. науч. работ / ВСТИСП ; редкол.: И. М. Куликов (гл. ред.) [и др.]. – М., 2017. – Т. 50. – С. 84–88.
21. Божидай, Т. Н. Особенности размножения *in vitro* и укоренения *ex vitro* голубики сорта Northblue / Т. Н. Божидай, Н. В. Кухарчик // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 4. – С. 28–31.
22. Божидай, Т. Н. Влияние генотипа и ауксина на процесс ризогенеза *ex vitro* сортов брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) / Т. Н. Божидай, Н. В. Кухарчик // Биотехнология в плодоводстве : материалы Междунар. науч. конф., Самохваловичи, 13–17 июня 2016 г. / РУП «Ин-т плодоводства» ; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2016. – С. 99–101.
23. Божидай, Т. Н. Влияние гормонального состава питательной среды и субстрата для адаптации на размножение сортов голубики узколистной / Т. Н. Божидай, Н. В. Кухарчик // Опыт и перспективы возделывания ягодных растений семейства Брусничные на территории Беларуси и сопредельных стран : материалы Междунар. науч. семинара, Минск, 18–19 июля 2017 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Центр. ботан. сад ; редкол.: В. В. Титок (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2017. – С. 3–7.
24. Божидай, Т. Н. Результативность микрочеренкования в условиях *ex vitro* растений рода *Vaccinium* L. / Т. Н. Божидай, Н. В. Кухарчик // Плодоводство : сб. науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства» ; редкол.: А. А. Таранов (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – Т. 30. – С. 181–185.
25. Гашенко, О. А. Влияние субстратов на ризогенез и адаптацию *ex vitro* растений-регенерантов ежевики / О. А. Гашенко, Н. В. Кухарчик // Плодоводство : сб. науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства» ; редкол.: А. А. Таранов (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2020. – Т. 32. – С. 134–138.

EFFICIENCY OF MICRO-GRAFTING OF BLACKBERRY MICROPLANTS IN *EX VITRO* CONDITIONS

O. A. HASHENKO, N. V. KUKHARCHIK

Summary

The research was carried out in 2019–2020 in the Department of Biotechnology of RUE “Institute of Fruit-growing” in the laboratory conditions. The purpose of the study was to evaluate the efficiency of micro-grafting of blackberry varieties in *ex vitro* conditions.

The carried out studies on the grafting of rooted *ex vitro* microshoots can be used to increase the commercial products output of blackberry varieties. During micro-grafting of blackberry varieties in *ex vitro* conditions, a 100 % output of rooted grafts was derived both on agropelrite substrate and on *Sphagnum* L. moss with a surface layer of peat “Dvina”. With the complex of morphometric indicators, it is more expedient to use a substrate consisting of *Sphagnum* L. moss with a surface layer of peat “Dvina”.

An authentic influence was established with a high level of significance ($p < 0.001$) of both varietal characteristics and substrate and two factors together on the length of shoots, the number of internodes and the length of roots of blackberry varieties. The number of roots depended only on the type of substrate ($p < 0.001$).

Key words: blackberry, *Rubus* L., micro-grafting, rooting, *ex vitro*, agropelrite, peat, *Sphagnum* L. moss, Belarus.

Поступила в редакцию 07.04.2021