

УДК 634.74:631.53:58.143.6(047.34)

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ ПРОИЗВОДСТВА ОЗДОРОВЛЕННОГО IN VITRO ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ (*ARÓNIA MELANOCÁRPA*)*

Н.В. Кухарчик, М.С. Кастрицкая, А.М. Малиновская

РУП «Институт плодоводства»,

ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,

e-mail: Kuchnataly@rambler.ru

РЕЗЮМЕ

В технологии определены: схема производства оздоровленного посадочного материала сортов аронии черноплодной; оборудование лаборатории и организация работ; отбор исходных растений; визуальная оценка исходных растений; ускоренное размножение *in vitro* (введение в культуру *in vitro*, питательные среды, микроразмножение, укоренение микропобегов, адаптация пробирочных растений в нестерильных условиях). Использование технологии экологически безопасно и позволяет получать оздоровленный посадочный материал аронии черноплодной, отличающийся высоким качеством и соответствующий современным требованиям.

Коэффициент размножения сортов аронии черноплодной в среднем за 1 пассаж составляет: Вениса – 8,1; Надзея – 8,7.

Укоренение *ex vitro* составляет при использовании экзогенной ИМК для замачивания (10,0 мг/л): Вениса – 62,1 %; Надзея – 90,6 %.

Укоренение *in vitro* составляет: Вениса – 100 %; Надзея – 100 %.

Адаптация *ex vitro* укорененных растений в нестерильных условиях на субстрате БИОНА-112 составляет 100 %.

Ключевые слова: арония черноплодная, размножение *in vitro*, ризогенез, адаптация, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Арония черноплодная – относительно новая культура, впервые завезенная на территорию Беларуси в 40-х годах 20-го века. Она ценится за питательные и лечебные свойства плодов, за декоративность и неприхотливость. В настоящее время арония черноплодная особенно популярна в Польше, где большие площади заняты промышленными насаждениями, а также в странах Европы и США [1, 2, 3, 4, 5]. В настоящее время два сорта белорусской селекции Вениса и Надзея включены в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь для промышленного возделывания [6]. Арония черноплодная становится все более и более востребованной из-за своих свойств в пищевой промышленности, а, следовательно, возрастает и потребность в высококачественном посадочном материале [7].

Известно, что наиболее легким способом размножения аронии черноплодной является семенной. Однако он неприемлем, особенно для промышленного использования,

*Рекомендован к публикации Ученым советом РУП «Институт плодоводства», протокол № 10 от 01.11.2013.

так как растения, выращенные из семян, весьма неоднородны по своим хозяйственно ценным признакам, поздно вступают в плодоношение, обладают неодновременным созреванием плодов, и, кроме того, зачастую характеризуются усиленным вегетативным ростом, что затрудняет механизированную уборку [1, 2]. Поэтому для широкого возделывания необходимо получать посадочный материал ценных высокопродуктивных сортов вегетативным способом. Метод размножения, представляющийся наиболее перспективным – это использование культуры *in vitro* для быстрого получения большого количества высококачественного посадочного материала наиболее ценных сортов аронии черноплодной. Имеющиеся в литературе работы по размножению аронии *in vitro* немногочисленны, но они свидетельствуют об успешности этого метода [7].

СТРУКТУРА РЕГЛАМЕНТА. В технологическом регламенте определены: схема производства оздоровленного посадочного материала сортов аронии черноплодной; оборудование лаборатории и организация работ; отбор исходных растений; визуальная оценка исходных растений по симптомам заражения заболеваниями; освобождение исходных растений от патогенов методом культуры *in vitro*, ускоренное размножение (введение в культуру *in vitro*, питательные среды, микроразмножение, укоренение микропобегов, адаптация пробирочных растений в нестерильных условиях).

Разработанная технология производства оздоровленных сортов аронии черноплодной не имеет аналогов в Республике Беларусь и соответствует европейским стандартам, предъявляемым Европейской организацией по защите растений (EPPO). Использование технологии экологически безопасно.

1. СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА ОЗДОРОВЛЕННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ

1. Отбор по помологическим признакам исходных растений аронии черноплодной, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород.
2. Оценка визуальных симптомов заражения всеми группами патогенных организмов, отбор визуально здоровых растений.
3. Введение визуально здоровых растений в культуру *in vitro*, присвоение исходным растениям статуса базовое растение (Nuclear stock, супер-суперэлита).
4. Содержание базовых растений в культуре *in vitro*, в закрытом или открытом грунте в условиях, исключающих реинфицирование воздушными или почвенными векторами переноса болезней.
5. Размножение базовых растений вегетативным способом и получение маточных растений (Propagation stock, суперэлита).
6. Содержание маточных растений в условиях, исключающих реинфицирование воздушными или почвенными векторами переноса болезней в открытом грунте.
7. Производство вегетативным способом элитного посадочного материала.

2. ОБОРУДОВАНИЕ ЛАБОРАТОРИИ И ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТ

Для оптимальной организации работ необходимо оборудовать следующие помещения:

1. *Ламинарная комната.* Отдельное помещение с легкомоющимися поверхностями стен и пола, оборудованное ламинарными столами, бактерицидной ультрафиолетовой лампой и бинокулярным микроскопом.

2. *Комната для приготовления питательных сред.* Необходимо следующее оборудование: дистиллятор, бидистиллятор; холодильники, водяная баня, электроплитки

или СВЧ-печь; магнитные или механические мешалки; рН-метр; весы (диапазоном до 1000 мг, до 20 г); лабораторная посуда (химические стаканы, колбы, мерные цилиндры, пипетки, пробирки и др.).

3. **Комната для мытья посуды**, оборудованная мойками и сухожарным шкафом для сушки и стерилизации посуды.

4. **Автоклавная комната**, оснащенная минимум тремя автоклавами (для стерилизации питательных сред, инфицированного материала и субстрата).

5. **Климатические комнаты** с оборудованием, предназначенным для поддержания благоприятного микроклимата: стеллажами с освещением, кондиционерами, вентиляторами, программным реле времени. Помещения должны соответствовать правилам асептики, легко стерилизоваться и не содержать материалов, в которых могут развиваться патогенные микроорганизмы (дерево, бумажные обои и др.).

6. **Комната для проведения ИФА**, оснащенная гомогенизатором, ридером, вошером, термостатом, холодильником, комплектом пипетдозаторов, одноразовых наконечников, пакетов для проб, набор реактивов для тестирования и др.

7. **Теплицы стеклянные**, предназначенные для второго этапа адаптации и размножения растений. Помещения должны соответствовать правилам асептики, легко стерилизоваться и не содержать материалов, в которых могут развиваться патогенные микроорганизмы.

8. **Теплицы сетчатые**, предназначенные для выращивания базовой коллекции и размножения растений. Помещения должны соответствовать правилам асептики, легко стерилизоваться и не содержать материалов, в которых могут развиваться патогенные микроорганизмы (дерево, бумажные обои и др.).

9. **Холодильные камеры** для хранения реактивов и депонирования растительного материала.

При выполнении работ по клональному микроразмножению необходимо соблюдать чистоту, при приготовлении сред и работе в ламинаре – правила асептики. Все помещения должны периодически обрабатываться антисептиками. Климатические комнаты ежемесячно обрабатывают ультрафиолетом и проводят аэрозольную дезинфекцию (формалин, 40 % в.р., 2%-ный рабочий раствор), а культуральную комнату для адаптации растений и теплицы периодически по мере надобности обрабатывают инсектицидами. Ламинар-боксы перед началом работы протирают 70%-ным этиловым спиртом и облучают ультрафиолетовыми лампами. Инструменты, завернутые в мешочную бумагу, предварительно прожаривают в сушильном шкафу при 140 °С в течение 2 часов (или 160 °С в течение часа), при работе инструменты содержат в стакане со спиртом и перед каждой манипуляцией обжигают в пламени спиртовой горелки. Халаты, бумажные матрасики, стерильную воду предварительно автоклавируют при 2 атм. в течение часа (или 1,5 атм. 1,5 часа) и вносят в бокс перед включением бактерицидных ламп. Посуду для маточных растворов сушат в сушильном шкафу при +160...+170 °С в течение часа. Стерилизация сред ведется при давлении 0,9-1 атм. в течение 15 минут.

Условия культивирования растений *in vitro*: освещение 2,5-3 тыс. люкс, температура +21...+23 °С, фотопериод 16/8 часов. Меристемы культивируют в пробирках размером 160×16 мм с объемом питательной среды 3 мл, при микроразмножении используют пробирки размером 200×22 мм с объемом питательной среды 5 мл.

3. ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИСХОДНЫХ РАСТЕНИЙ

Отбор и выделение исходных растений сортов аронии черноплодной по помологическим признакам проводится помологом.

Сорта аронии черноплодной Вениса и Надзея.

Вениса. Происхождение: от свободного опыления отборной формы. Сорт зимостойкий, урожайный (до 10 т/га при схеме посадки 3,5 x 2,5 м). Куст среднерослый, среднераскидистый. Расположение ягод в щитке среднее. Биологические особенности: сорт самоплодный. Период вегетации – 190 дней. Расположение ягод в щитке среднее. Относительно устойчив к болезням и вредителям. Вступает в плодоношение на 3, 4-й год. Плодоношение регулярное. Ягоды крупные (средняя масса – 1,3 г), количество в щитке – 18 шт., одномерные, яблоковидной, несколько овальной формы. Окраска черная, с сизым восковым налетом. Созревание одновременное. Висят долго, не осыпаясь, отличаются высоким содержанием фенольных соединений. Привлекательный внешний вид. Дегустационная оценка в свежем виде – 3,9 балла, продуктов переработки – 4,8 балла. Ягоды приятного сладко-кислого, несколько вяжущего вкуса. Сорт универсального назначения. В Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь включен в 2008 г.

Надзея. Происхождение: от свободного опыления отборной формы. Сорт зимостойкий, урожайный (до 10 т/га при схеме посадки 3,5 x 2,5 м). Куст среднерослый, среднераскидистый. Биологические особенности: сорт самоплодный. Период вегетации – 190 дней. Расположение ягод в щитке среднее. Вступает в плодоношение на 3, 4-й год. Плодоношение регулярное. Относительно устойчив к вредителям и болезням. Ягоды крупные (средняя масса – 1,2 г), одномерные, количество в щитке – 13 шт., яблоковидной, несколько овальной формы. Окраска плодов черная, с сизым восковым налетом. Созревание одновременное. Привлекательный внешний вид. Дегустационная оценка в свежем виде – 3,8 балла, продуктов переработки (коктейль из черноплодной рябины на яблочном соке) – 4,8 балла. Ягоды приятного сладко-кислого, несколько вяжущего вкуса. Сорт универсального назначения. В Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь включен в 2008 г.

Визуальная фитосанитарная оценка осуществляется специалистом по защите растений методом маршрутных обследований насаждений. Проводят минимум три обследования: в начале, середине периода вегетации и в период созревания ягод. При этом осматривают каждое растение, отмечают симптомы и номер растения. Следует обращать внимание на крапчатости, пятнистости, некрозы, на морщинистость или другие аномалии роста листьев, на габитус растения, состояние ягоды.

4. ОЗДОРОВЛЕНИЕ ИСХОДНЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

4.1 Введение в культуру *in vitro*

Для введения в культуру сортов аронии черноплодной выбирают материнские растения с доказанной сортовой принадлежностью, визуально здоровые.

Тип экспланта: исходный материал (верхушечные и боковые почки), взятый от выбранных материнских растений, очищают от кроющих чешуй, промывают проточной водой в течение 1-2 часов.

Стерилизация: почки поверхностно стерилизуют в ламинар-боксе по следующей схеме: промывка проточной водой в течение 1 часа, обработка 70%-ным этанолом в течение 5 секунд, затем 0,1%-ным раствором сулемы в течение 3 минут с последующей трехкратной промывкой стерильной водой (3 раза по 5 минут).

Введение *in vitro*: меристематический апекс размером до 1,0 мм выделяют с помощью бинокулярного микроскопа при увеличении × 8-12 и специального набора инструментов. Сразу же после выделения апекс помещают в пробирку на питательную среду. Каждой меристеме присваивают порядковый номер (номер клона).

4.2 Питательные среды

Для культивирования сортов аронии черноплодной используют питательную среду Мурасиге и Скуга (MS).

Маточные растворы. Для удобства в работе и сокращения затрат времени на приготовление питательной среды рекомендуется готовить маточные растворы макро- и микросолей (таблица 1). Для приготовления растворов используют бидистиллированную воду.

Таблица 1 – Состав маточных растворов питательной среды MS

Название реактива		Количество в 100 мл маточного раствора, мг	Объем маточного раствора на 1 л среды, мл
Макросоли	Аммоний азотнокислый (NH_4NO_3)	16500	10
	Калий азотнокислый (KNO_3)	19000	10
	Магний сернокислый, семиводный ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3700	10
	Калий фосфорнокислый, однозамещенный (KH_2PO_4)	1700	10
	Кальций хлористый, двухводный ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4400	10
Хелат железа	Железо сернокислое, семиводное ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	557	5
	Трилон Б (Na_2 ЭДТА $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	745	
Микросоли	Марганец сернокислый, четырехводный ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	2230	1
	Цинк сернокислый, семиводный ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	860	
	Кислота борная (H_3BO_3)	620	
	Калий йодистый (KI)	83	
	Натрий молибденовокислый, двухводный ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	25	
	Медь сернокислая, пятиводная ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	2,5	
	Кобальт хлористый, шестиводный ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	2,5	

Раствор хелата железа кипятят 2-3 минуты, хранят в холодильнике (+2...+4 °С) в сосуде из темного стекла не более 4-6 недель. Растворы макро- и микросолей хранят в холодильнике (+2...+4 °С) не более 4-6 недель. Маточные растворы витаминов готовят из расчёта 100 мг в 100 мл, разливают порционно и хранят в морозильной камере при температуре -20 °С. Биологически активные вещества (БАВ) готовят из расчета 1 мг в 1 мл и растворяют: ауксины и гиббереллины в спирту, цитокинины в щелочи.

Приготовление среды. Для приготовления среды отмеряют указанное в таблице 1 количество маточных растворов и переливают их в мерный стакан. Затем добавляют нужное количество витаминов и биологически активных веществ, сахарозу и доводят объём дистиллированной водой до 1 л, pH до 5,6-5,7 с помощью слабых растворов соляной кислоты и едкого натра (таблица 2). В полученный раствор вносят агар (4-7 г/л, в зависимости от типа) и нагревают на водяной бане или СВЧ до растворения агара. Горячая среда разливается в пробирки или иные ёмкости, которые закрываются пробками или фольгой, среда автоклавируется.

Таблица 2 – Рекомендуемые концентрации витаминов, фитогормонов и углеводов в питательных средах на различных этапах микроразмножения сортов аронии черноплодной

Компонент среды	Питательная среда, мг/л		
	для введения in vitro	для микро- размножения	для укоренения
Пиридоксина гидрохлорид (витамин В ₆)	0,5	0,5	0,5
Тиамина гидрохлорид (витамин В ₁)	0,5	0,5	0,5
Никотиновая кислота (витамин РР)	0,5	0,5	0,5
6-бензиладенин (БА)	0,5	0,5	-
Гибберелловая кислота (ГК)	1,0	1,0	-
Индолилмасляная кислота (ИМК)	-	-	0,1
Сахароза	30000	30000	20000

4.3 Микроразмножение

Конгломераты микрорастений разделяют на отдельные растения и высаживают на свежую питательную среду для размножения (таблицы 1, 2). Все регенеранты, полученные с одной меристемы, обозначают порядковым номером исходной меристемы (номер клона).

Длительность пассажа составляет 30 дней.

Количество пассажей – не более 7 в процессе культивирования одной введенной меристемы.

4.4 Укоренение микропобегов

Для ризогенеза используют только регенеранты высотой более 1,5 см.

Укоренение in vitro

Питательная среда для ризогенеза: для укоренения регенерантов аронии лучшей является среда с ½ концентрации макро- и микросолей по MS, хелатом железа, витаминами В₁, В₆, РР, ИМК, сахарозой (таблицы 1, 2).

Длительность этапа ризогенеза in vitro 8 недель.

Укоренение ex vitro

Субстрат для укоренения: БИОНА-112, длительность этапа ризогенеза ex vitro 8 недель.

4.5 Адаптация растений-регенерантов

Корни растений промывают в слабом растворе марганцевокислого калия для удаления остатков среды. Регенеранты высаживают в плашки глубиной около 5-7 см или в кассеты с диаметром ячейки 4-5 см. В кассету или плашку высаживают растения только одного сорта и с одним номером меристемы. Растения накрывают полиэтиленовой плёнкой или прозрачной крышкой, чтобы создать условия 100%-ной влажности. Через 2 недели пленку приоткрывают, затем снимают. Начало нового роста адаптируемых регенерантов свидетельствует о завершении адаптации. После пересадки на второй этап адаптации, растения подкармливают раствором ½ макро- и микросолей по MS.

Условия адаптации: освещение 2,5-3 тыс. люкс, температура +20...+22 °С, фото-период 16/8 часов.

Субстраты для адаптации: БИОНА-112 – первый этап адаптации, смесь торфа и песка в отношении 3:1 – второй этап адаптации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В технологическом регламенте определены: схема производства оздоровленного посадочного материала сортов аронии черноплодной; оборудование лаборатории и организация работ; отбор исходных растений; визуальная оценка исходных растений по симптомам заражения болезнями; освобождение исходных растений от патогенов методом культуры *in vitro*, ускоренное размножение (введение в культуру *in vitro*, питательные среды, микроразмножение, укоренение микропобегов, адаптация пробирочных растений в нестерильных условиях). Приведены расчеты стоимости оздоровленных растений и содержания базовых растений.

Разработка соответствует европейским стандартам, предъявляемым Европейской организацией по защите растений (EPPO). Использование технологии экологически безопасно. Использование разработанной технологии позволяет получать оздоровленный посадочный материал аронии черноплодной, отличающийся высоким качеством и соответствующий современным требованиям.

Коэффициент размножения сортов аронии черноплодной в среднем за 1 пассаж составляет: Вениса – 8,1; Надзея – 8,7.

Укоренение *ex vitro* составляет при использовании экзогенной ИМК для замачивания (10,0 мг/л): Вениса – 62,1 %; Надзея – 90,6 %.

Укоренение *in vitro* составляет: Вениса – 100 %; Надзея – 100 %.

Адаптация *ex vitro* укорененных растений в нестерильных условиях на субстрате БИОНА-112 составляет 100 %.

Себестоимость адаптированных растений (на 01.01.2013) приведена в таблице 3.

Таблица 3 – Расчет себестоимости получения посадочного материала аронии черноплодной в культуре *in vitro*

Статья затрат	Единица измерения	Количество	Стоимость единицы, тыс. руб.	Итого на 1 тыс. саженцев, тыс. руб.
Заработная плата (с начислениями) старшего научного сотрудника и лаборанта	месяц	3,2/15	4 993,6/ 9 759,0	14 753
Амортизационные отчисления (лаборатория, теплицы, приборы)	месяц	1	3 843	3 843
Прочие расходы (теплоэнергия, электроэнергия, услуги АТГ, связь, коммунальные услуги)	месяц	1	14 683	9 683
Стоимость химических реактивов для питательной среды <i>in vitro</i>	литр	57	24 123	1 375
Стоимость лабораторной посуды и контейнеров	-	-	-	3 890
Стоимость субстратов для адаптации (БИОНА, торф, перлит)	кг	50/500/18	-	1 400
Другие расходные материалы	-	-	-	1 000
Всего				21 191
Накладные расходы				3 814
Итого				25 005
Стоимость 1 растения в контейнере			25 000 руб.	

Литература

1. Исаченко, Л.М. Комплексное изучение сортов и гибридов аронии черноплодной по основным хозяйственно-биологическим признакам / Л.М. Исаченко // Плодоводство: науч. тр. / Ин-т плодоводства Национальной академии наук Беларуси; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2006. – Т. 18, ч. 1. – С. 115-118.
2. Eggert, P. Aronia – roslina dla gospodarstw ekologicznych / P. Eggert // Haslo ogrodnizce [Electronic resource]. – 2006. – № 6. – Mode of access: <http://www.ho.haslo.pl/article.php?id=2782>. – Date of access: 24.01.2011.
3. Kleparski, J. Aronia / J. Kleparski // Haslo ogrodnizce [Electronic resource]. – 2003. – № 2. – Mode of access: <http://www.ho.haslo.pl/article.php?id=1150>. – Date of access: 24.01.2011.
4. Kleparski, J. Uprawa aronii znów oplacalna / J. Kleparski // Haslo ogrodnizce [Electronic resource]. – 2001. – № 11. – Mode of access: <http://www.ho.haslo.pl/article.php?id=835>. – Date of access: 24.01.2011.
5. Kleparski, J. Aronia "czarny koń" naszego sadownictwa / J. Kleparski // Haslo ogrodnizce [Electronic resource]. – 2000. – № 11. – Mode of access: <http://www.ho.haslo.pl/article.php?id=584>. – Date of access: 24.01.2011.
6. Сорта плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда, включенные в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород и находящиеся на испытании в Государственной инспекции по испытанию и охране сортов растений / РУП «Институт плодоводства». – Самохваловичи, 2010. – 25 с.
7. Litwińczuk, W. Propagation of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Elliot) through in vitro culture / W. Litwińczuk // Electronic journal of polish agricultural universities [Electronic resource]. – 2002. – № 6. – Mode of access: <http://www.ejpau.media.pl/volume5/issue2/horticulture/art-06.html>. – Date of access: 20.11.2010.

PROCESS GUIDE OF PRODUCTION OF IMPROVED IN VITRO PLANTING MATERIAL OF CHOKEBERRY (*ARÓNIA MELANOCÁRPA*)

N.V. Kukharchik, M.S. Kastritskaya, A.M. Malinovskaya

RESUME

The technology determines the scheme of production of the improved planting material of chokeberry cultivars; laboratory equipment and work organization; selection of parental plants; visual estimation of parental plants and accelerated in vitro propagation (introduction in culture in vitro, nutritional media, micropropagation, rootage of microshoots, adaptation of test-tube plants in non-sterile conditions). The use of the technology is ecologically safe. It also allows receiving the improved chokeberry planting material which is distinguished by high quality and corresponds to modern requirements.

The propagation ratio of chokeberry cultivars on the average for 1 passage makes at the cultivar Venisa 8.1 and at the cultivar Nadzeya it is 8.7.

Ex vitro rootage makes 62.1 % for the cultivar Venisa and 90.6 % for the cultivar Nadzeya at use of exogenous IMK for steeping (10.0 mg/l).

In vitro rootage makes 100 % for the cultivars Venisa and Nadzeya.

Ex vitro adaptation of the rooted plants in non-sterile conditions on the substrate BIONA-112 makes 100 %.

Key words: chokeberry, propagation in vitro, risogenesis, adaptation, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 20.02.2014