

УДК 634.73:581.143.6

ВЛИЯНИЕ ТИПА ЭКСПЛАНТА НА РЕГЕНЕРАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ЧЕРНИКИ, ГОЛУБИКИ, БРУСНИКИ И КЛЮКВЫ НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO

Т.Н. Божидай, Н.В. Кухарчик

РУП «Институт плодоводства»,

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

e-mail: tanya_bozhidaj@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Тип первичного экспланта – один из основных факторов, влияющих на эффективность инициации культуры *in vitro*. Целью исследования было определить типы эксплантов черники, голубики, брусники и клюквы, обладающие высокой регенерационной способностью на этапе введения в культуру *in vitro*. В ходе исследования установлено достоверное влияние типа экспланта на долю некротировавших эксплантов черники и брусники ($p < 0,05$), голубики ($p < 0,01$), на количество жизнеспособных эксплантов черники ($p < 0,05$) и голубики ($p < 0,001$), а также на количество регенерировавших эксплантов клюквы ($p < 0,001$). На этапе введения в культуру *in vitro* высокой жизнеспособностью (более 66,6 %) характеризовались однопочковые черенки черники, вегетативные почки, щитки и однопочковые черенки голубики и брусники, а также верхушечные части побегов клюквы. Максимальное количество регенерировавших эксплантов отмечено у однопочковых черенков черники (67,0 %) и верхушечных частей побегов клюквы (73,9 %).

Ключевые слова: *Vaccinium* spp., культура *in vitro*, инициация, тип экспланта, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных факторов, влияющих на эффективность инициации культуры *in vitro*, является тип первичного экспланта. В качестве экспланта для введения в культуру *in vitro* можно использовать различные ткани и органы растений. Выбор типа экспланта во многом зависит от вида растения, предрасположенности его к тому или иному способу размножения, а также от необходимости освобождения растения от вирусов. Культивирование растений из апикальных меристем позволяет получать оздоровленный посадочный материал практически всех сельскохозяйственных культур [1].

Введение *in vitro* меристематических верхушек предполагает достаточно длительный период инициации начала роста и развития меристемы в пригодный для микроразмножения конгломерат, наличие специального оборудования и высококвалифицированного персонала, а также требует больших затрат времени на стабилизацию культуры. Поэтому интерес представляют и ускоренные методы введения в культуру *in vitro* – посадка на питательные среды более крупных эксплантов. Метод введения в культуру *in vitro* крупных эксплантов может являться наиболее перспективным при размножении свободных от вирусов растений, а также при необходимости размножения редких генотипов без учета их фитосанитарного статуса [2].

Положительный эффект при использовании крупных эксплантов определяется простотой посадки их в пробирки, высокой скоростью пробуждения почек и активной пролиферацией их в последующих пассажах, а также при развитии крупных эксплантов

на питательных средах всегда отмечается прямой органогенез, отсутствует дедифференциация тканей, что особенно важно при использовании культуры *in vitro* в масштабном микроразмножении сортов [2].

Согласно литературным данным, для введения в культуру *in vitro* растений рода *Vaccinium* L. в качестве экспланта используются черенки, почки, меристемы, части стерильных проростков (эпикотиль, гипокотиль, стебелек, корешок, семядоли, листья, верхушка проростка) [3–14].

Максимальное количество регенерантов на эксплант, при введении представителей рода *Vaccinium* L., было получено при использовании в качестве экспланта апекса проростка, однако процесс получения эксплантов из стерильных проростков трудоемкий и длительный [5, 7].

Установлено, что ювенильные экспланты голубики обладают большей регенерационной способностью по сравнению с таковыми у брусники, в то время как у зрелых эксплантов голубики регенерационный потенциал отсутствует. Этот факт свидетельствует о зависимости регенерационного потенциала не только от типа экспланта, но и от видовых особенностей материала [7].

Цель исследования – определить типы первичных эксплантов черники, голубики, брусники и клюквы, обладающие высокой регенерационной способностью на этапе введения в культуру *in vitro*.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства». Материалом для исследования служили экспланты черники (*Vaccinium myrtillus* L.), голубики (*Vaccinium corymbosum* L.) сортов Duke и Patriot, брусники (*Vaccinium vitis-idaea* L.) сортов Koralle и Erntesegen, клюквы (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) сортов Ben Lear, McFarlin и Stevens.

В качестве эксплантов черники и голубики на этапе введения использовали меристемы, вегетативные почки, щитки, однопочковые черенки; брусники – вегетативные почки, щитки, однопочковые черенки; клюквы – однопочковые и двухпочковые черенки, верхушечные части побегов.

Стерилизацию исходного материала проводили по следующей схеме: обработка 0,2%-ным бенлатом – 30 минут; обработка 70%-ным этанолом – 10 секунд; обработка 30%-ной перекисью водорода – 5 минут; промывка стерильной дистиллированной водой – 3 раза по 5 минут.

Выделенные экспланты культивировали на агаризованной питательной среде: макро- и микросоли по среде для культивирования древесных растений (Woody Plant Medium, WPM) [15] с добавлением биологически активных веществ (таблица).

Таблица – Биологически активные вещества в питательной среде на этапе инициации культуры *in vitro* представителей рода *Vaccinium* L.

Компонент питательной среды	Концентрация компонентов в среде, мг/л
Тиамин гидрохлорид (B ₁)	1,0
Пиридоксин гидрохлорид (B ₆)	0,5
Никотиновая кислота (PP)	0,5
Аскорбиновая кислота (C)	1,0
Глицин	2,0
Мезоинозит	100,0
Зеатин	2,0

Стерилизацию среды проводили при давлении 0,9 атм. в течение 15 мин после введения в нее всех необходимых витаминов и физиологически активных веществ.

Условия культивирования эксплантов: освещение 2,5–3,0 тыс. лк, температура +21...+23 °С, фотопериод 16/8 ч. Длительность субкультивирования – 4 недели.

Опыты проводили в 3-кратной повторности с неодинаковым числом эксплантов в каждом варианте.

Статистическую обработку проводили в программе Statistica 6.0, используя ANOVA, однофакторный дисперсионный анализ, критерий Дункана ($p < 0,05$) для сравнения средних значений. Построение графиков проводили в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические характеристики растений обусловили выбор эксплантов для введения в культуру *in vitro* (рисунок 1). Так, размер вегетативных почек брусники и клюквы не позволил выделить из них жизнеспособную меристему.

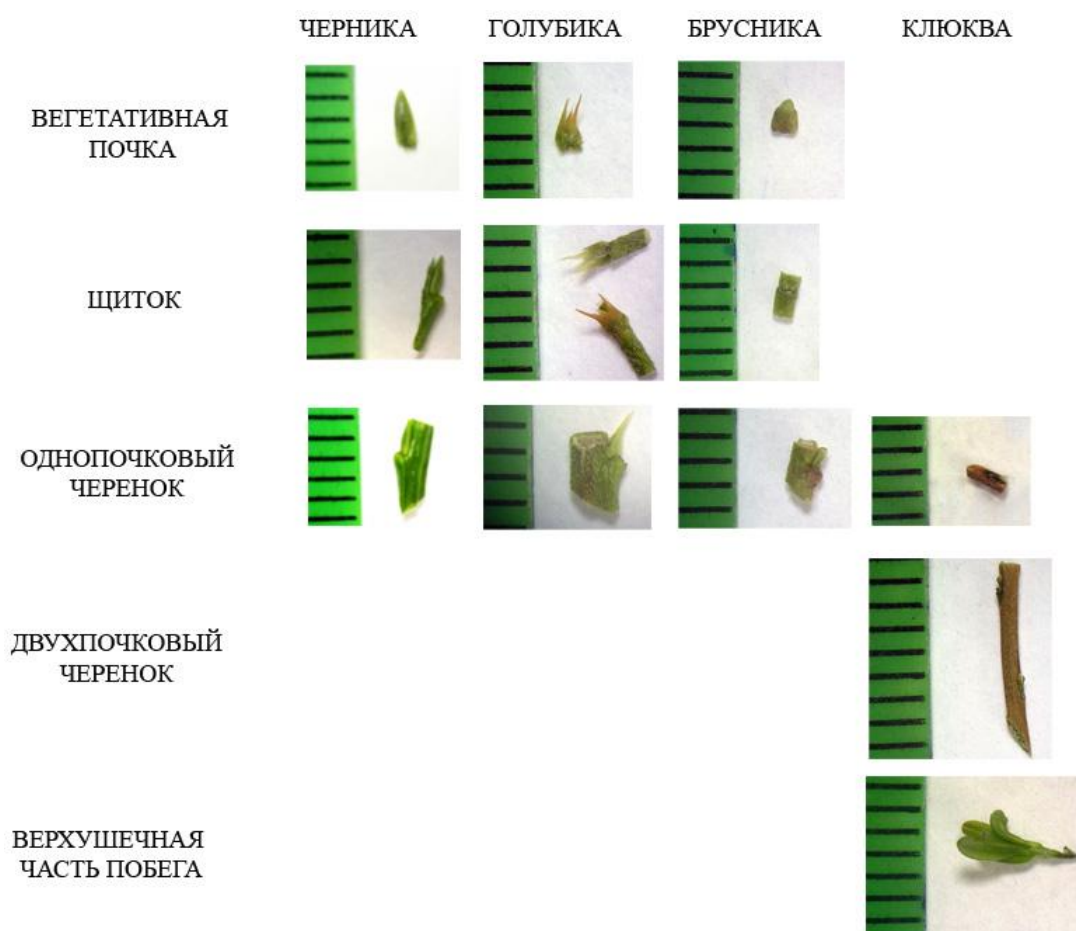


Рисунок 1 – Типы первичных эксплантов черники, голубики, брусники и клюквы для введения в культуру *in vitro*.

Анализ полученных данных показал, что тип экспланта оказывает значимое влияние на долю некротировавших эксплантов черники и брусники ($p < 0,05$), голубики ($p < 0,01$), на количество жизнеспособных эксплантов черники ($p < 0,05$) и голубики ($p < 0,001$), а также на количество регенерировавших эксплантов клюквы ($p < 0,001$).

При введении в культуру *in vitro* разных типов эксплантов черники, голубики, брусники и клюквы отмечается увеличение количества инфицированных эксплантов и уменьшение некротировавших с увеличением размера первичного экспланта (рисунок 2).

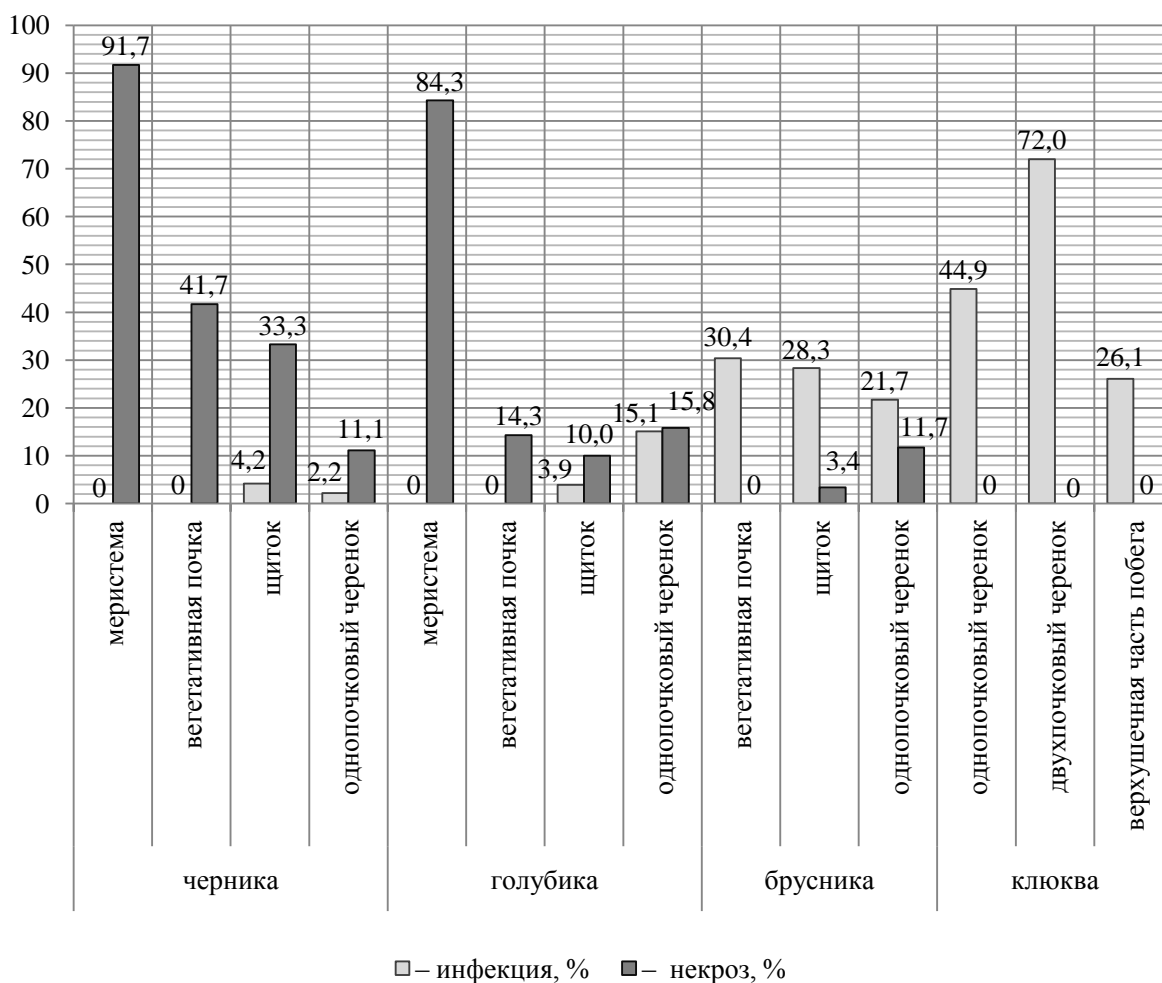


Рисунок 2 – Доля инфицированных и некротировавших эксплантов представителей рода *Vaccinium* L. при введении в культуру *in vitro*.

Выход жизнеспособных эксплантов от введенных в культуру *in vitro* для изучаемых видов рода *Vaccinium* L. составил в среднем 8,3–86,7 %, регенерировавших – 0–73,9 % (рисунок 3).

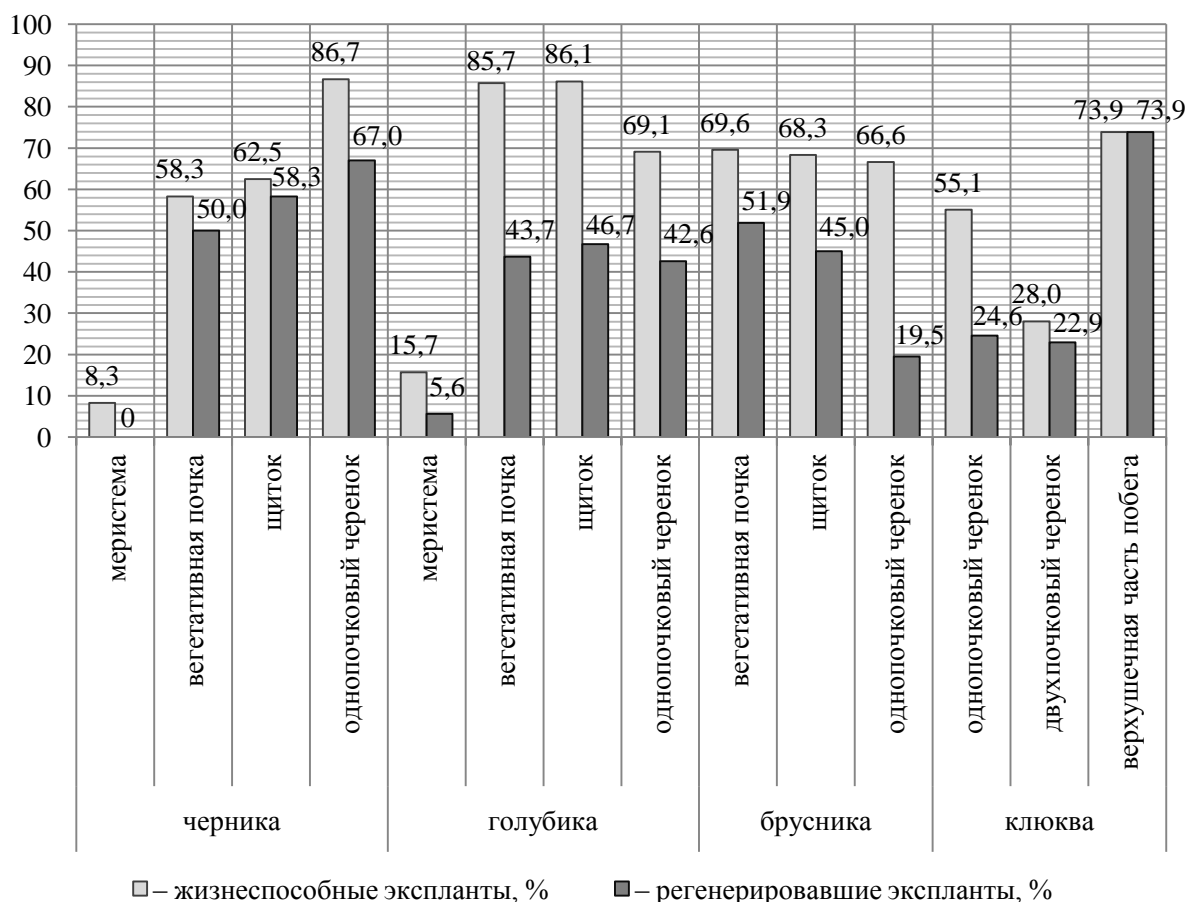


Рисунок 3 – Влияние типа экспланта на количество жизнеспособных и регенерировавших эксплантов черники, голубики, брусники и клюквы.

Наибольшее число жизнеспособных и наименьшее некротировавших эксплантов черники было получено при использовании в качестве первичных эксплантов однопочковых черенков (86,7 % и 11,0 % соответственно), голубики – щитков (86,1 % и 10,0 %) и вегетативных почек (85,7 % и 14,3 %), клюквы – верхушечных частей побегов (73,9 % и 0 %). У брусники при использовании различных типов эксплантов выход жизнеспособных составил в среднем 66,6–69,6 %, некротировавших – от 0 (вегетативная почка) до 11,6 % (однопочковый черенок).

Наиболее высокой регенерационной способностью на этапе введения в культуру *in vitro* из изучаемых типов эксплантов черники обладали однопочковые черенки (67,0 % регенерировавших эксплантов), голубики – щитки (46,7 %), вегетативные почки (43,7 %) и однопочковые черенки (42,6 %), брусники – вегетативные почки (51,9 %) и щитки (45,0 %), клюквы – верхушечные части побегов (все жизнеспособные экспланты – 73,9 % – сформировали конгломерат микропобегов).

Введение в культуру *in vitro* крупных эксплантов (вегетативных почек, щитков, одно- и двухпочковых черенков, верхушечных частей побегов) представителей рода *Vaccinium* L. позволило установить, что минимальной регенерационной способностью в среднем отличались экспланты голубики. В то же время, количество регенерировавших эксплантов, т. е. потенциально пригодных для размножения, выше у черники и верхушечных частей побегов клюквы. Для голубики и брусники характерна большая разница

между количеством жизнеспособных эксплантов и регенерировавших, большое количество введенных в культуру *in vitro* эксплантов не развивается и, соответственно, непригодно для размножения.

ВЫВОДЫ

На этапе введения в культуру *in vitro* высокой жизнеспособностью (более 66,6 %) характеризовались однопочковые черенки черники, вегетативные почки, щитки и однопочковые черенки голубики и брусники, а также верхушечные части побегов клюквы.

Максимальное количество регенерировавших эксплантов отмечено у однопочковых черенков черники (67,0 %) и верхушечных частей побегов клюквы (73,9 %).

При введении в культуру *in vitro* разных типов эксплантов *Vaccinium* spp. с увеличением размера первичного экспланта отмечается увеличение количества инфицированных и уменьшение некротировавших эксплантов.

Литература

1. Калинин, Ф.Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сарнацкий. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
2. Кухарчик, Н.В. Вегетативное размножение плодовых и ягодных культур *in vitro* / Н.В. Кухарчик [и др.] // Генетические основы селекции растений: в 4 т.; науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Мн.: Беларус. навука, 2012. – Т. 3: Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. – Гл. 5. – С. 289–315.
3. Брилкина, А.А. Особенности микрклонального размножения представителей подсемейства брусничные / А.А. Брилкина, Е.Е. Павлова // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: тез. междунар. конф., Звенигород, 8–12 сентября 2008 г. / Российская Академия наук, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Всероссийское общество физиологов растений, Научный совет РАН по проблемам физиологии растений и фотосинтеза; под ред. А.В. Носова. – М., 2008. – С. 52–53.
4. Кутас, Е.Н. Научные основы клонального микроразмножения растений на примере интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.12 / Е.Н. Кутас; Моск. с.-х. акад. им. К.А. Тимирязева. – М., 1997. – 35 с.
5. Кутас, Е.Н. Регенерационный потенциал селекционных гибридов (сем. *Vacciniaceae* S.F. Gray) в зависимости от типа экспланта / Е.Н. Кутас, И.Н. Малахова, А.А. Горещкая // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2011. – № 1. – С. 13–15.
6. Решетников, В.Н. Некоторые аспекты микрклонального размножения голубики высокой и брусники обыкновенной / В.Н. Решетников, Т.В. Антипова, В.Л. Филипеня // Плодоводство: науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства»; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2007. – Т. 19. – С. 209–215.
7. Сидорович, Е.А. Влияние экспланта на процесс клонального микроразмножения интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной в культуре *in vitro* / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 1997. – № 4. – С. 12–17.
8. Debnath, S.C. Improved shoot organogenesis from hypocotyl segments of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) / S.C. Debnath // *In Vitro Cellular and Developmental Biology. – Plant.* – 2003. – Vol. 39. – P. 490–495.

9. Efficient micropropagation protocol for highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Elliot / L.A. Vescan [et al.] // Romanian Biotechnological Letters. – 2012. – Vol. 17, № 1. – P. 6893–6902.

10. In vitro propagation of *Vaccinium* species / M.G. Ostrolucka [et al.] // Acta Universitatis Latviensis, Biology. – 2004. – Vol. 676. – P. 207–212.

11. Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture in vitro / A. Gajdosova [et al.] // Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. – 2006. – Vol. 14. – P. 103–119.

12. Micropropagation of bilberry and lingonberry / L. Jaakola [et al.] // Acta Horticulturae. – 2002. – Vol. 574. – P. 401–403.

13. Protocols for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. / M.G. Ostrolucka [et al.] // Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits; eds. S.M. Jain, H. Haggman. – Berlin, 2007. – P. 445–455.

14. Smagula, J.M. Cranberry micropropagation using a lowbush blueberry medium / J.M. Smagula, J. Harker // Acta Horticulturae. – 1997. – Vol. 446. – P. 343–347.

15. Lloyd, G. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture / G. Lloyd, B. McCown // Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society. – 1980. – Vol. 30. – P. 421–427.

INFLUENCE OF EXPLANT TYPE ON REGENERATIVE CAPACITY OF BILBERRY, BLUEBERRY, LINGONBERRY AND CRANBERRY AT THE STAGE OF IN VITRO INITIATION

T.N. Bozhidaj, N.V. Kukharchik

ABSTRACT

Type of explant is one of the main factors that influence the efficiency of initiation of culture in vitro. The aim of the research was to determine the types of explants of bilberry, blueberry, lingonberry and cranberry with high regenerative capacity at the stage of in vitro initiation. It was established a significant influence of type of explant on the number of necrotic explants of bilberry and lingonberry ($p < 0.05$), blueberry ($p < 0.01$), viable explants of bilberry ($p < 0.05$) and blueberry ($p < 0.001$) and regenerated explants of cranberry ($p < 0.001$). Stem cutting (with one bud) of bilberry, vegetative bud, shield-bud and stem cutting (with one bud) of blueberry and lingonberry, shoot tips of cranberry had high viability (over 66.6 %) at the stage of in vitro initiation. The maximum number of regenerated explants was noted for stem cuttings (with one bud) of bilberry (67.0 %) and shoot tips of cranberry (73.9 %).

Key words: *Vaccinium* spp., in vitro culture, initiation, type of explant, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 17.01.2014