

УДК 634.22:631.541.11:581.143.6

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ СЛИВЫ IN VITRO

Н.В. Кухарчик<sup>1</sup>, О.В. Соловей<sup>1</sup>, М.С. Кастрицкая<sup>1</sup>,  
Л.Ю. Тычинская<sup>2</sup>, Г.Д. Полешко<sup>2</sup>, Е.Г. Залесская<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РУП «Институт плодородия»,

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

e-mail: Kuchnataly@rambler.ru; belhort@it.org.by

<sup>2</sup>ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»,

ул. Сурганова, 13, г. Минск, 220072, Беларусь

### РЕЗЮМЕ

Объектами исследований явились растения-регенеранты клонового подвоя сливы ВПК-1, выращиваемые в закрытой системе, в культуре *in vitro* на агаризованных питательных средах; методы исследований – ионная хроматография, атомно-эмиссионная спектроскопия, элементный анализ. Проведен сравнительный анализ потребления элементов питания (ионов  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  и микроэлементов – железо, марганец, цинк, бор) растениями-регенерантами на этапе микроразмножения из модифицированной нами и традиционной среды Мурасиге и Скуга. Определена сравнительная структура потребления ионов и элементов из питательных сред, оценено накопление их в растениях-регенерантах. На экспериментальной среде отмечено практически полное использование основных элементов питания: аммонийная и нитратная формы азота использовались растениями-регенерантами клонового подвоя сливы на 99,7 %, ионы магния и калия – на 46,8-59,2 %.

Ключевые слова: клоновые подвои сливы, минеральное питание, питательная среда, культура *in vitro*, ионная хроматография, атомно-эмиссионная спектроскопия, элементный анализ, Беларусь.

### ВВЕДЕНИЕ

Эффект дисбаланса ионов и избыточных концентраций солей в водных растворах на растения подтвержден большим количеством исследований. Растения в таких условиях характеризуются ингибированием фотосинтеза, пигментной системы, нарушением проницаемости мембран и другими физиологическими аномалиями [1-5]. В то же время совсем немного информации о влиянии этих же факторов на развитие растений, выращиваемых в закрытых системах, на искусственных питательных средах, в частности в культуре *in vitro*. Ионы кальция определяют рост и деление клеток, структурную стабильность и проницаемость мембран в тканях растений, регулируют катионно-анионный баланс и активность энзимов [6]. Z. Rengel сообщает [7], что вредное воздействие ионов натрия, избыточная концентрация которых отмечается в питательной среде и по нашим предыдущим исследованиям, на растения может быть снижено увеличением внешней концентрации ионов кальция. Однако повышение концентрации ионов кальция в питательных средах в случае использования в форме хлорида может привести к

нарушению роста плодовых растений. Последствия дисбаланса ионов на различных этапах культивирования *in vitro* могут привести как к ухудшению роста и размножения растений *in vitro*, так и к неспособности растений к адаптации в условиях *ex vitro*.

**Цель исследований** – определение потребности минеральных компонентов питательных сред растениями-регенерантами клоновых подвоев сливы для дальнейшей оптимизации условий выращивания микрорастений на этапах микроразмножения и укоренения *in vitro*.

## МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Культуральные исследования проведены в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства», физико-химические анализы в ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси».

### **Объекты, условия и методы проведения исследований:**

*Объекты исследований:*

- растения-регенеранты клонового подвоя сливы ВПК-1 на различных этапах культивирования *in vitro*; агаризованные питательные среды.

*Методы проведения исследований:*

- биотехнологический (культура апикальных меристем и микроразмножение *in vitro*);  
- физико-химические (атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой (VISTA Pro, Varian, США); ионная хроматография (система ICS-3000, Dionex, США/Германия); элементный анализ (CHNS-анализатор VarioMicroCube, Elementar, Германия).

**Методика культивирования изолированных тканей *in vitro*.** Для проведения исследований используют методики: Методика адаптации регенерантов *ex vitro* [8]; Методика микроразмножения подвоев яблони *in vitro* [9]; Методика культивирования изолированных зародышей вишни и сливы [10]; Методика микроразмножения смородины чёрной *in vitro* [11].

**Режимы культивирования и техника проведения стерильных работ.** Условия культивирования растений *in vitro*: освещение 2,5-3 тыс. лк, температура +21...+23 °С, фотопериод 16/8 час. Длительность субкультивирования 4 недели. Растения культивируют в пробирках размером 200×22 мм с объёмом питательной среды 10 мл. Стерилизация сред ведется при давлении 1 атм. в течение 15 мин. Для культивирования используют минеральный состав питательной среды Мурасиге и Скуга (MS) и разработанной среды 9.3.29.

**Методика пробоподготовки** качественного и количественного анализа элементов в образцах питательных сред и растениях-регенерантах:

1. Питательная среда наливается в пробирки по 10 мл, пробирки со средой автоклавируют, часть пробирок одной партии предназначается для анализа исходных составляющих среды, на оставшиеся пробирки высаживают растения.

2. Через 40 дней (в конце пассажа) анализируют состав питательной среды после пассажа, а также извлеченное и высушенное растение-регенерант [12].

3. Расчет использованных элементов проводится в пересчете на вес питательной среды на момент посадки растений-регенерантов, расчёт остаточной концентрации элементов в среде – на вес питательной среды в конце пассажа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На этапе микроразмножения экспланты, высаженные на искусственные питательные среды, представляли собой микрорастения высотой 7 мм с несколькими междоузлиями.

Как показали предварительные исследования, на этапе микроразмножения сливы отмечается незначительное поглощение эксплантами элементов питания из искусственных сред, максимальное снижение концентрации отмечено для  $\text{NH}_4^+$  (16-43 %),  $\text{SO}_4^{2-}$  (13-22 %) и  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (27-50 %). На основании полученных данных разработаны новые прописи (таблица 1) составляющих основу питательных сред для микроразмножения и ризогенеза клоновых подвоев сливы, на которые высажены микрорастения подвоев для размножения и укоренения. В прописи минимизировано количество ионов хлора, магния, калия и уменьшено содержание натрия, хлористый кальций заменен на азотнокислый.

Таблица 1 – Питательные среды для культивирования клоновых подвоев сливы

Компоненты среды Мурасиге и Скуга		Компоненты среды 9.3.29 слива	
наименование макро- и микросолей	концентрация, мг/л	микроразмножение	ризогенез
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	825	1650
$\text{KNO}_3$	1900	0	0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	0	0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0	110	110
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	3,7	3,7
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	170	170
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,3	18,7	18,7
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8	27,8
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	6,2	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	8,6
KJ	0,83	0,83	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025

Оценены морфологические характеристики растений-регенерантов, выращенных на этапе микроразмножения на модифицированной питательной среде 9.3.29. В качестве контроля использованы растения-регенеранты на традиционной питательной среде MS.

Полученные на питательной среде MS растения в момент извлечения из пробирки были очень хрупкими, рассыпались на листочки, что является признаком слабой степени витрификации. Средний вес извлеченных растений-регенерантов составлял 519 мг, и колебался по образцам практически в 2 раза: от 342 до 678 мг. Вес воздушно-сухих растений в среднем составлял 106 мг.

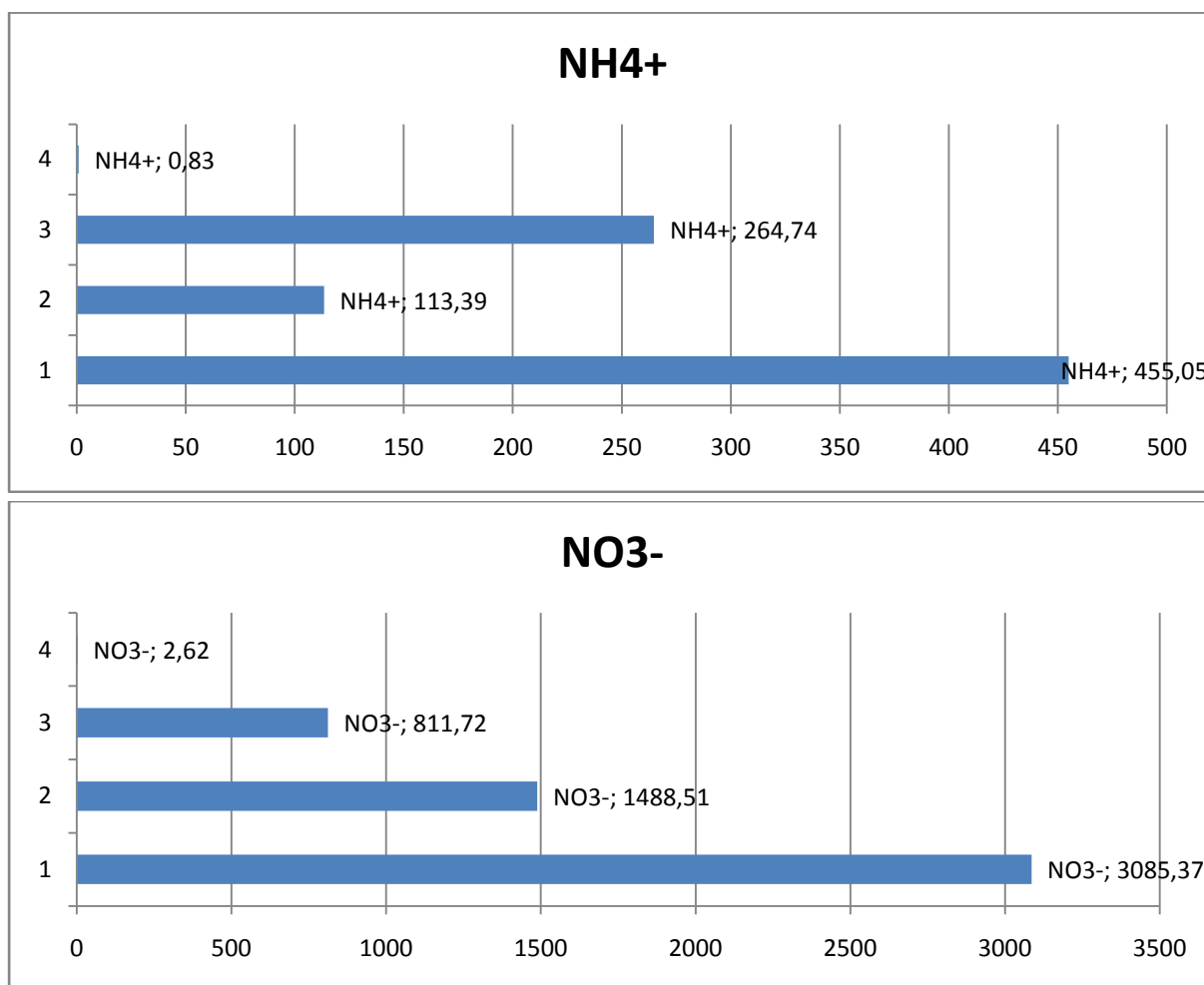
На экспериментальной питательной среде 9.3.29 растения в момент извлечения из пробирки были прочные, оставались целыми даже при промывании. Средний вес извлеченных растений-регенерантов составлял 859 мг и колебался по образцам от 732 до 1022 мг. Вес воздушно-сухих растений в среднем составлял 159 мг, что на 53 мг (50 %) выше, чем у растений на стандартной питательной среде. Кроме того, растения на экспериментальной питательной среде более выровненные и имеют больший коэффициент размножения (8–11 и 3–5 соответственно). В качестве недостатка разработанной питательной среды необходимо отметить аномальное изменение окраски растений-регенерантов (появление бордовых оттенков), которое исчезает при дальнейших пересадках. Изменение окраски растений-регенерантов сливы на экспериментальной питательной среде может быть обусловлено практически полным использованием основных элементов питания из искусственной среды клоновым подвоем сливы. В таблице 2 приведено изменение концентрации основных элементов питания в искусственных средах MS и 9.3.29 в процессе культивирования эксплантов сливы.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика динамики элементов питания в контрольной и экспериментальной питательных средах (ионная хроматография)

Питательная среда	Содержание ионов, мг/кг								
	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
	<b>Контрольная среда MS</b>								
Исходная	48,08	455,05	945,05	51,51	149,52	247,76	181,16	3085,37	141,18
Остаточная*	49,08	113,39	749,01	40,65	136,1	179,47	144,8	1488,51	61,32
	Поглощение ионов из питательной среды, %								
	–	75,08	20,74	21,08	8,98	27,56	20,07	51,76	56,57
	<b>Экспериментальная среда 9.3.29</b>								
Исходная	44,04	264,74	60,07	21,29	56,89	15,41	88,08	811,72	128,82
Остаточная*	23,44	0,83	4,14	8,69	24,27	5,38	3,17	2,62	8,27
	Поглощение ионов из питательной среды, %								
	46,78	99,69	93,11	59,18	57,34	65,09	96,40	99,68	93,58
Примечание. * – питательная среда после культивирования регенерантов in vitro.									

Очевидно, что через месяц культивирования клоновых подвоев сливы in vitro концентрация основных элементов питания в контрольной среде снижается незначительно, в особенности для катионов натрия, калия, магния, кальция. Существенное уменьшение концентрации отмечено только для NH<sub>4</sub><sup>+</sup> и анионов NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

В экспериментальной питательной среде через месяц культивирования эксплантов концентрации оставшихся ионов (за исключением натрия и кальция) крайне незначительны. Аммонийная и нитратная формы азота практически отсутствуют (рисунок).



1 – исходная среда MS; 2 – остаточная среда MS;  
3 – исходная среда 9.3.29; 4 – остаточная среда 9.3.29.

Рисунок – Изменение концентраций аммонийной и нитратной форм азота в процессе культивирования клоновых подвоев сливы на контрольной и экспериментальной питательных средах.

Одновременно с определением использования элементов питания из искусственной питательной среды проведено изучение накопления элементов в растениях-регенерантах, выращиваемых на контрольной и экспериментальной питательных средах (таблица 3). Необходимо отметить существенное снижение (в 6,5 раза) калия, некоторое снижение магния и цинка в растениях, выращенных на экспериментальной среде. Количество кальция, фосфора и железа изменяется незначительно. Увеличение концентрации отмечено для таких элементов, как натрий и марганец.

Таблица 3 – Содержание макро- и микроэлементов в сухих растениях клонового подвоя сливы на этапе микроразмножения (атомно-эмиссионная спектроскопия)

Образец	P <sub>сух.</sub> , г	Содержание элементов, г/кг							
		Ca	P	K	Mg	Fe	Mn	Zn	Na
Слива, среда MS, этап размножения	0,0736	2,945	2,959	26,444	1,048	0,190	0,173	0,216	0,627
Слива, среда 9.3.29, этап размножения	0,1349	2,629	2,263	4,031	0,796	0,194	0,271	0,174	1,396

Примечание. P<sub>сух.</sub> – средний вес 1 высушенного растения (105 °С).

В таблице 4 представлены данные по содержанию элементов, накопленных в растениях-регенерантах сливы и использованных из питательной среды, в пересчете на одно растение в течение одного пассажа: 1 – накопление элементов 1 растением-регенерантом; 2 – потребление элементов питания из агаризованной среды 1 растением (1 пробирка). В пересчете на одно растение клоновый подвой сливы на экспериментальной питательной среде содержал значительно больше исследуемых элементов, за исключением калия, вес сухого растения при этом был выше на 55 %.

Таблица 4 – Содержание макро- и микроэлементов, накопленных в растениях-регенерантах сливы (атомно-эмиссионная спектроскопия) и использованных из питательной среды (ионная хроматография), в пересчете на 1 растение

Образец	P <sub>сух.</sub> , г*	**	Содержание элементов, мг/растение							
			Ca	P	K	Mg	Fe	Mn	Zn	Na
Слива, среда MS, этап размножения	0,0736	1	0,22	0,22	1,94	0,08	0,014	0,013	0,016	0,05
		2	0,22	0,22	2,20	0,12	-	-	-	0,03
Слива, среда 9.3.29, этап размножения	0,1349	1	0,35	0,31	0,54	0,11	0,026	0,037	0,023	0,19
		2	0,29	0,32	0,46	0,11	-	-	-	0,19

Примечание. P<sub>сух.</sub>\* – средний вес 1 высушенного растения;  
 \*\*1 – накопление элементов 1 растением-регенерантом; 2 – потребление элементов питания из агаризованной среды 1 растением (1 пробирка).

Накопление в растениях клоновых подвоев сливы других элементов исследовано с использованием элементного анализа (CHNS-анализатор). Доля азота и серы в растениях на контрольной среде выше более чем в два раза, углерода и водорода – практически не различается (таблица 5). Необходимо отметить, что азот и сера поступают в растения-регенеранты из питательной среды и, соответственно, их накопление зависит от концентрации соответствующих питательных элементов в среде, а углерод и водород – из питательной среды и воздуха (таблица 6).

Таблица 5 – Результаты определения содержания элементов углерода, водорода, азота, серы в сухих образцах растений-регенерантов сливы на контрольной и модифицированной питательных средах

Образец	P <sub>сух.</sub> , г	повторность	N (%)	S (%)	C (%)	H (%)
Слива, среда MS, этап размножения	0,0736	1	7,02	0,289	43,61	6,166
		2	6,98	0,269	42,87	6,004
Слива, среда 9.3.29, этап размножения	0,1349	1	2,65	0,101	45,72	6,189
		2	2,76	0,092	46,07	6,291
Примечание. P <sub>сух.</sub> – средний вес 1 высушенного растения.						

Таблица 6 – Сравнение содержания элементов азота и серы в образцах растений и убыли соответствующих элементов из питательной среды

Образец	*P <sub>сух.</sub> , г	N, мг		S, мг	
		**Содержание в 1 растении	***Извлеклось из среды	Содержание в 1 растении	Извлеклось из среды
Слива, среда MS, этап размножения	0,0736	5,15	5,45	0,21	0,14
Слива, среда 9.3.29, этап размножения	0,1349	3,65	3,16	0,26	0,23
Примечание. *P <sub>сух.</sub> – средний вес 1 высушенного растения; ** – элементный анализ; *** – ионная хроматография.					

Данные, полученные методом ионной хроматографии (с последующим пересчетом на элементы) и методом элементного анализа, позволили провести сравнительный анализ количества элементов, извлеченных из питательной среды и накопленных в растениях-регенерантах *in vitro*. Уменьшение количества азота в питательной среде 9.3.29 привело к снижению его потребления растением и, соответственно, накопления в растении. В то же время снижение количества серы в среде не отразилось на использовании ее растением сливы, что, вероятно, является признаком избыточного количества серы в контрольной питательной среде.

## ВЫВОДЫ

Растения-регенеранты, выращенные в культуре *in vitro* на питательной среде Мурасиге и Скуга и экспериментальной, различались по морфологическим характеристикам, потреблению элементов питания из искусственных питательных сред и химическому составу.

Вес воздушно-сухих растений на экспериментальной среде в среднем составляет 159 мг, что на 50 % выше, чем у растений на стандартной питательной среде MS.

На экспериментальной среде отмечено практически полное использование основных элементов питания, аммонийная и нитратная формы азота использовались растениями-регенерантами клонового подвоя сливы на 99,7 %, ионы магния и калия – на 46,8-59,2 %.

В течение одного пассажа одно растение клонового подвоя сливы на экспериментальной среде накапливало большее количество элементов, потребляемых из среды (Ca, P, Mg, Fe, Mn, Zn, Na), за исключением калия, азота и серы, содержание углерода и водорода, поглощаемых из питательной среды и из воздуха, в растениях-регенерантах сливы не различалось.

#### Литература

1. McKensie, B.D. Stress and Stress Cropping in Cultivated Plants / B.D. McKensie, Y.A. Leshen // Kluwer Academic Publishers, London. – 1994. – 475 p.
2. Salisbury, F.B. Plant Physiology / F.B. Salisbury, W.C. Ross. – Wadsworth, Inc., Belmont, 1992. – 682 p.
3. Ashraf, M. Photosynthetic parameters at the vegetative stage and during grain development of two hexaploid cultivars differing in salt tolerance / M. Ashraf, N. Parveen // Biol. Plant. – 2002. – V. 45. – P. 401-407.
4. Karimi, G. The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in *Kochia prostrata* / G. Karimi [et al.] // Biol. Plant. – 2005. – V. 49. – P. 301-304.
5. Sotiropoulos, T.E. Effect of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M 4 cultured in vitro / T.E. Sotiropoulos // Biologia plantarum. – 2007. – V.51. – N 1. – P. 177-180.
6. Marschner, H. Mineral Nutrition of Higher Plants / H. Marschner // Academic Press, London. – 1995. – 889 p.
7. Rengel, Z. The role of calcium in salt toxicity / Z. Rengel // Plant Cell Environ. – 1992. – V. 15. – P. 625-632.
8. Кухарчик, Н.В. Адаптация регенерантов *ex vitro* / Н.В. Кухарчик [и др.] // Плодоводство: сб. науч. тр. / Ин-т плодоводства НАН Беларуси; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2006. – Т. 18. – Ч. 2. – С. 174-181.
9. Самусь, В.А. Методика микроразмножения подвоев яблони *in vitro* / В.А. Самусь [и др.] // Плодоводство: сб. науч. тр. / Ин-т плодоводства НАН Беларуси; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2006. – Т. 18. – Ч. 2. – С. 146-156.
10. Кухарчик, Н.В. Методика культивирования изолированных зародышей вишни и сливы / Н.В. Кухарчик, М.С. Кастрицкая, Р.В. Пугачев // Плодоводство: сб. науч. тр. / Ин-т плодоводства НАН Беларуси; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2006. – Т. 18. – Ч. 2. – С. 157-162.
11. Колбанова, Е.В. Методика микроразмножения смородины черной *in vitro* / Е.В. Колбанова, Н.В. Кухарчик // Плодоводство: сб. науч. тр. / Ин-т плодоводства НАН Беларуси; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2006. – Т. 18. – Ч. 2. – С. 163-168.
12. Кухарчик, Н.В. Структура потребления растениями-регенерантами смородины чёрной минеральных компонентов питательных сред при культивировании *in vitro* / Н.В. Кухарчик [и др.] // Плодоводство: науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства»; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2012. – Т. 24. – С. 106-116.



## NUTRITIONAL MEDIUM OPTIMISATION FOR IN VITRO CULTIVATION OF PLUM CLONAL ROOTSTOCKS

N.V. Kukharchik, O.V. Solovej, M.S. Kastritskaya, L.Yu. Tychinskaya,  
G.D. Poleshko, E.G. Zalesskaya

### SUMMARY

Regenerant plants of a plum rootstock VPK-1 cultivating in a closed system (in vitro culture on agar media) were the objects of the research. Ionic chromatography, atomic emission spectroscopy and element analysis were the methods. There was carried out a comparative analysis of nutritional elements consumption ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , N, S, H, C, Fe, Mn, Zn, B) by regenerant plants from a modified by us and a traditional Murashige and Skoog medium at the micropropagation stage. A comparative structure of ions and elements consumption from nutritional media was determined. The accumulation of ions and elements in regenerant plants was estimated. Almost full use of basic nutritional elements was marked at the experimental medium. As a result, ammonia-N and nitrate nitrogen were used by regenerant plants of plum clonal rootstock by 99.7 %, magnesium and potassium ions were used by 46.8-59.2 %.

Key words: plum clonal rootstocks, mineral nutrition, nutritional media, in vitro culture, ionic chromatography, atomic emission spectroscopy, element analysis, Belarus.

*Дата поступления статьи в редакцию 28.03.2013*