

УДК 634:581.143.6:631.811

МИНЕРАЛЬНОЕ ПИТАНИЕ И МОРФОГЕНЕЗ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ IN VITRO НЕКОТОРЫХ ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

Н.В. Кухарчик¹, Е.В. Колбанова¹, Т.А. Красинская¹, А.М. Малиновская¹,
М.С. Кастрицкая¹, Л.Ю. Тычинская², В.П. Сокол²

¹РУП «Институт плодородия»,

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

e-mail: belhort@it.org.by

²ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»,

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

РЕЗЮМЕ

Объектами исследований были растения-регенеранты плодовых и ягодных культур, выращиваемые в закрытой системе, в культуре *in vitro* на агаризованных питательных средах; методы исследований – ионная хроматография и атомно-эмиссионная спектроскопия. Проведен сравнительный анализ потребления элементов питания (ионов NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , H_2PO_4^- и микроэлементов – железо, марганец, цинк, бор) из искусственных сред растениями-регенерантами клоновых подвоев вишни, сливы, сортов смородины черной и аронии черноплодной на этапах микроразмножения и ризогенеза. Определена структура потребления ионов и элементов из питательных сред, их количественная оценка. Выявлены различия в количестве потребляемых элементов питания у культур на различных этапах выращивания *in vitro*. Максимальное количество ионов из искусственной питательной среды потребляют растения-регенеранты смородины черной как в ходе микроразмножения, так и при укоренении. Для исследуемых культур значительно различается потребление обеих форм азота и калия. Потребность в H_2PO_4^- , Mg^{2+} , SO_4^{2-} для культур колеблется незначительно.

Ключевые слова: смородина чёрная, арония черноплодная, клоновые подвои вишни и сливы, минеральное питание, искусственная питательная среда, ионная хроматография, атомно-эмиссионная спектроскопия, культура *in vitro*, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из задач культивирования изолированных тканей *in vitro* является получение высококачественных растений по приемлемым ценам. Исходя из этого, оптимизация любых этапов выращивания в культуре *in vitro*, от подготовки питательных сред и инициации культуры до адаптации, приводящая к повышению коэффициентов размножения, результативности введения *in vitro*, ризогенеза и адаптации, улучшению морфологических характеристик растений-регенерантов, способствует решению поставленной задачи. Возможность контроля и регулирования освещения, влажности внутри культурального сосуда, так же как и состава питательной среды приведет к созданию оптимальных условий выращивания растений-регенерантов на каждом этапе культуры *in vitro* [1, 2].

Традиционное культивирование растений *in vitro* характеризуется низкой концентрацией углекислого газа и низким уровнем фотосинтетически активной радиации

внутри пробирок, добавлением в питательные среды сахарозы, как основного энергетического резерва. Выращивание растений-регенерантов в гетеротрофных условиях способствует развитию различных физиологических и анатомических аномалий, препятствует нормальному развитию фотосинтетического аппарата, что незначимо в условиях *in vitro*, однако препятствует нормальной адаптации растений *ex vitro* [3].

Минеральные и органические компоненты питательной среды и правильно подобранные их концентрации способствуют оптимизации роста растений *in vitro*. Традиционные питательные среды для культуры *in vitro* плодовых и ягодных растений содержат, как правило, высокие концентрации азота и низкие, например, фосфора. В то же время потребность в конкретных элементах питания отличается для различных культур и этапов онтогенеза [4, 5, 6, 7].

Изучение потребления элементов питания конкретными культурами на определенных этапах развития и модификация питательных сред может прямо или косвенно влиять на доступность элементов в искусственных средах, изменять тип питания растений из гетеротрофного на автотрофный, изменять pH питательной среды, определяющей доступность элементов питания [8, 9].

Цель исследований – определение потребления минеральных компонентов питательных сред растениями-регенерантами клоновых подвоев вишни, сливы, сортов смородины чёрной и аронии черноплодной 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 плововодств», физико-химические анализы – в ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси».

Объекты, условия и методы проведения исследований:

Объекты исследований:

- растения-регенеранты клоновых подвоев вишни (GiSelA 5, ВСЛ-2) и сливы (ВПК-1), сортов смородины черной (Церера, Память Вавилова) и аронии черноплодной (Вениса) на различных этапах культивирования *in vitro*; агаризованные питательные среды.

Методы проведения исследований:

- биотехнологический (культура апикальных меристем и микроразмножение *in vitro*);
- физико-химические: ионная хроматография, атомно-эмиссионная спектроскопия.

Методика культивирования изолированных тканей *in vitro*. Для проведения исследований используют методики: Методика адаптации регенерантов *ex vitro* [10]; Методика микроразмножения подвоев яблони *in vitro* [11]; Методика культивирования изолированных зародышей вишни и сливы [12]; Методика микроразмножения смородины чёрной *in vitro* [13].

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

Методика пробоподготовки, качественного и количественного анализа элементов в образцах питательных сред с использованием системы ионной хроматографии ICS-3000 (Dionex, США/Германия) и атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой – спектрометр VISTA PRO (Varian, США) [14].

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

2. Через 40 дней (в конце пассажа) анализируют состав питательной среды после культивирования на ней растений-регенерантов. 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

Для высадки на этап микроразмножения использовали одномерные экспланты, однако через 40 дней культивирования размер полученных растений-регенерантов существенно различался. Коэффициент размножения смородины черной на первом и втором пассажах колебался от 2,8 до 4; аронии – 6–9; клонового подвоя вишни – 10–11,5; клонового подвоя сливы – 2–3. Средний вес воздушно-сухого растения (конгломерата микрочеренков) сортов смородины и клоновых подвоев вишни был наибольшим: Церера – 137 мг, Память Вавилова – 124 мг, GiSelA 5– 124 мг, ВСЛ-2 – 123 мг, арония (51 мг), подвой сливы (38 мг). Вес воздушно-сухих растений после этапа ризогенеза (укорененный микрочеренок) составил: смородина черная – 126–135 мг, клоновые подвои вишни и сливы – 80–70 мг, арония – 40 мг.

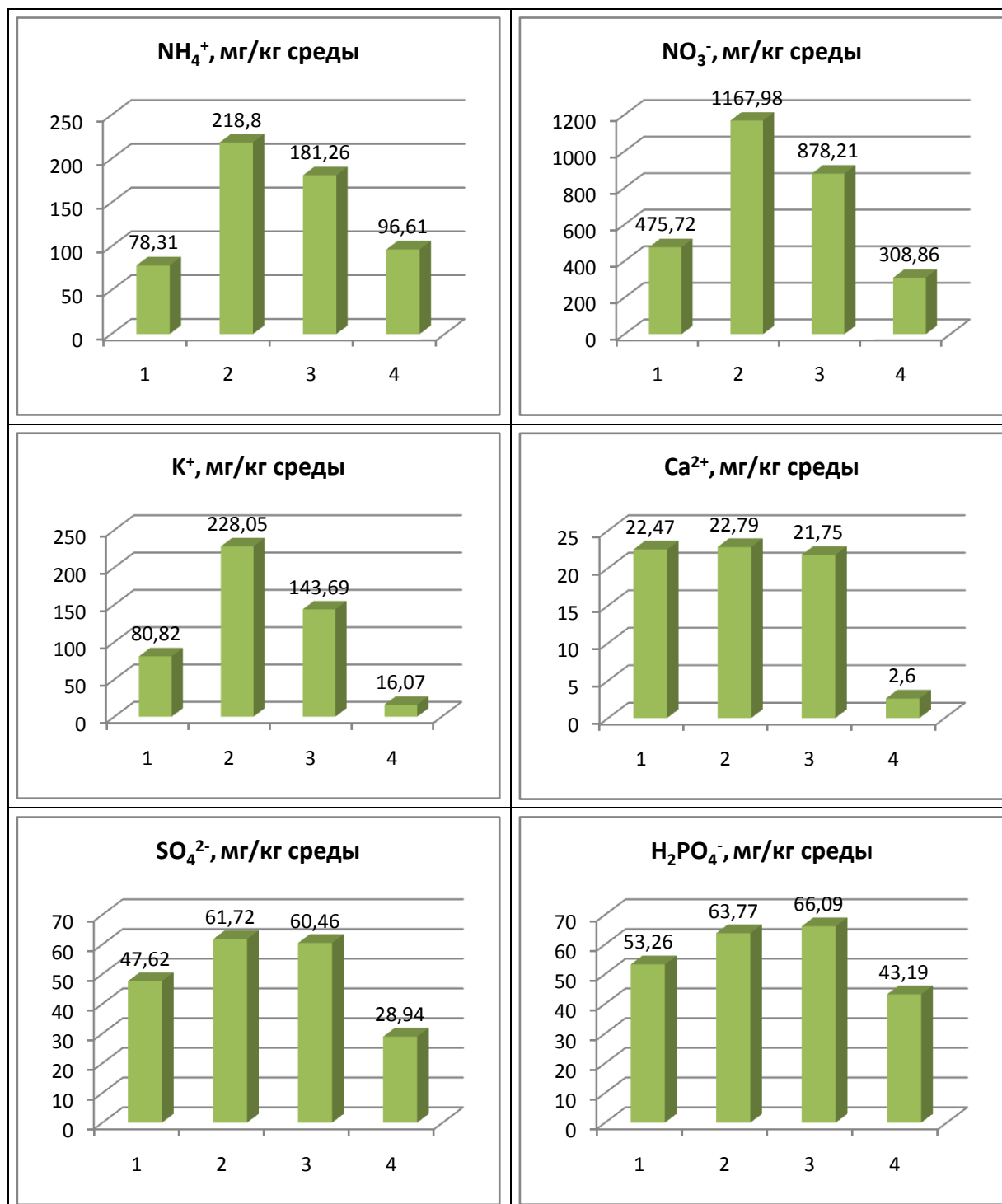
Сравнительный анализ потребления основных элементов питания из среды на этапе микроразмножения *in vitro* различных культур показал, что максимальное количество всех ионов используют растения-регенеранты смородины черной (среднее по сортам) – что, согласуется и с самым большим весом растений смородины, несколько ниже – клоновые подвои вишни (среднее по формам подвоев) (рисунок 1). Клоновый подвой сливы характеризуется минимальным потреблением ионов из питательной среды и одновременно с этим худшими морфологическими характеристиками растений-регенерантов. Арония черноплодная, несмотря на относительно низкие показатели потребления ионов из питательной среды и незначительным весом конгломерата микрорастений, визуально характеризуется хорошим ростом растений-регенерантов и высоким коэффициентом размножения.

Азот максимально используется растениями-регенерантами сортов смородины, затем в порядке убывания вишней, аронией и сливой. Данная последовательность характерна как для нитратной, так и для аммонийной формы, причем все культуры в большей степени используют нитратный азот. Соотношение нитратного и аммонийного азота для аронии составляет 6:1, смородины черной – 5,4:1, вишни – 4,9:1, сливы – 3,2:1.

Калий также в максимальных количествах используется активно растущей в культуре *in vitro* смородиной черной. Арония черноплодная использует практически в 3 раза меньше калия, а клоновый подвой вишни – в два раза, несмотря на близкие морфологические показатели роста на искусственных средах на этапе микроразмножения. Потребность в калии наиболее существенно отличается у исследуемых культур на этапе размножения *in vitro*.

Использование серы, фосфора и магния из искусственной питательной среды различается незначительно для исследуемых культур, за исключением клоновых подвоев сливы, для которых показатели потребления ниже по всем анализируемым элементам.

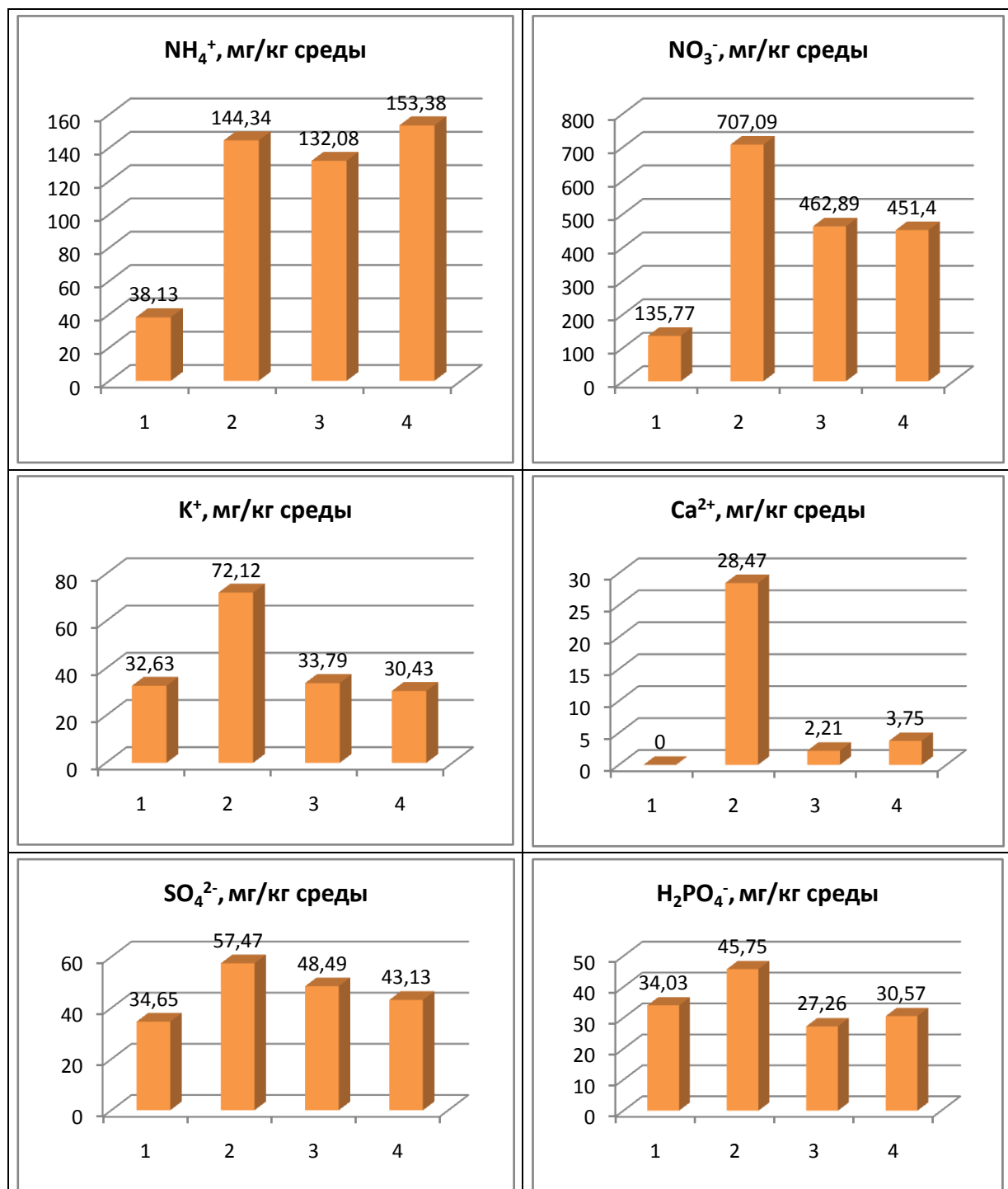
Кальций используется в одинаковых количествах растениями-регенерантами смородины, аронии и вишни, в то время как потребление данного элемента у подвоя сливы в 9 раз ниже.



1 – арония черноплодная, 2 – смородина черная, 3 – клоновые подвои вишни, 4 – клоновые подвои сливы

Рисунок 1 – Сравнительное количество макроэлементов, поглощенных в среднем одним растением различных культур в течение пассажа микроразмножения из питательной среды (мг/кг среды).

На этапе ризогенеза смородина, по-прежнему, характеризуется максимальным потреблением ионов из питательной среды, значительное превышение отмечено для ионов калия и кальция, причем кальций остальными культурами практически не используется (рисунок 2).



1 – арония черноплодная, 2 – смородина черная, 3 – клоновые подвои вишни,
4 – клоновые подвои сливы

Рисунок 2 – Сравнительное количество макроэлементов, поглощенных различными культурами (в среднем одним растением) в течение пассажа ризогенеза из питательной среды (мг/кг среды).

Растения-регенеранты аронии черноплодной на этапе ризогенеза используют существенно меньше элементов питания из искусственной среды, чем на этапе микроразмножения и чем остальные культуры на этапе ризогенеза. Вес укорененного растения также гораздо меньше. В то же время результативность ризогенеза и дальнейшей адаптации аронии высокая.

Клоновый подвой сливы на этапе ризогенеза потребляет существенно больше, в первую очередь, азота, чем в течение микроразмножения, причем возрастает потребление как нитратной, так и аммонийной формы.

Соотношение нитратного и аммонийного азота на этапе ризогенеза для остальных культур изменяется одинаково – отмечается относительное снижение NO_3^- (для аронии соотношение $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ составляет 3,6:1, смородины черной – 4,9:1, вишни – 3,5:1, сливы – 2,9:1).

Использование микроэлементов растениями-регенерантами из питательных сред ранее практически не исследовалось, в первую очередь по причине незначительного количества их в питательных средах и отсутствия адекватных методик их определения в агаризованных средах. В работе приведены предварительные результаты исследований по потреблению плодовыми и ягодными культурами микроэлементов. Данные получены на основании расчета разницы между содержанием микроэлементов в исходных и остаточных (после 40 дней культивирования на них растений-регенерантов) питательных средах.

Для смородины черной количество микросолей, добавляемых в питательные среды, на этапе ризогенеза изначально (в соответствии с рекомендациями) уменьшается в два раза. В то же время, растения-регенеранты при ризогенезе используют практически в 5 раз больше бора, несколько больше цинка и марганца. Уменьшается в 2,5 раза только потребление железа (рисунок 3).

Потребление железа и марганца растениями-регенерантами аронии практически не изменяется на различных этапах культивирования, бора – увеличивается, цинка – уменьшается. При микроразмножении и ризогенезе регенеранты аронии черноплодной используют анализируемые микроэлементы (в порядке убывания, мг на 100 растений-регенерантов): железо (2,45 и 2,62), марганец (0,86 и 0,80), цинк (0,82 и 0,44), бор (0,10 и 0,31).

Для клоновых подвоев вишни отмечено увеличение потребления всех исследуемых микроэлементов на этапе ризогенеза.

Количество потребляемых микроэлементов при культивировании клоновых подвоев сливы минимально по сравнению с другими культурами и на этапе микроразмножения не позволяет достоверно отметить потребление отдельных элементов, в том числе бора и марганца. При ризогенезе использование микроэлементов растениями клоновых подвоев сливы увеличивается и составляет 20,37–48,96 % от наличия в питательной среде.

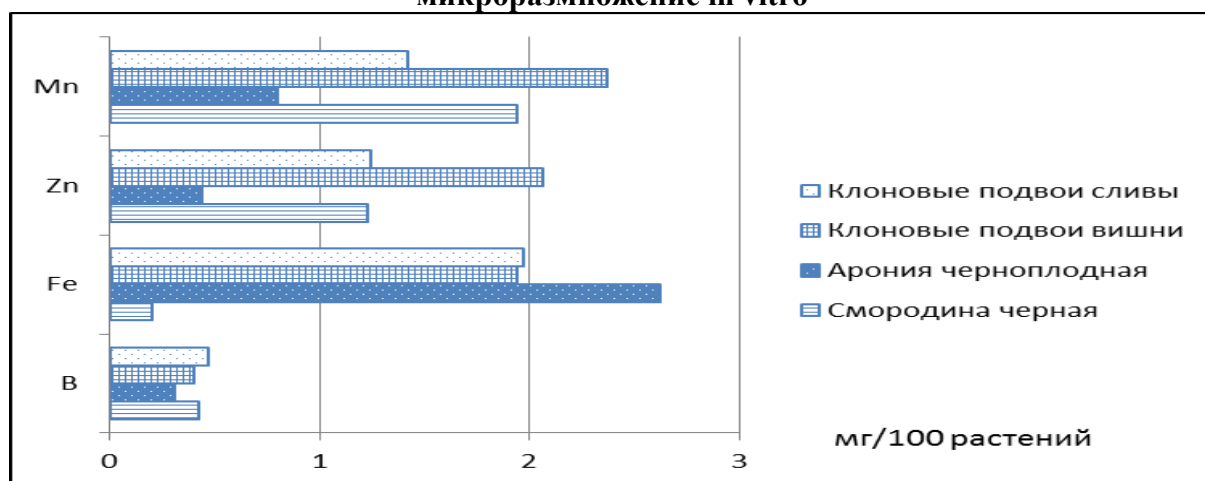
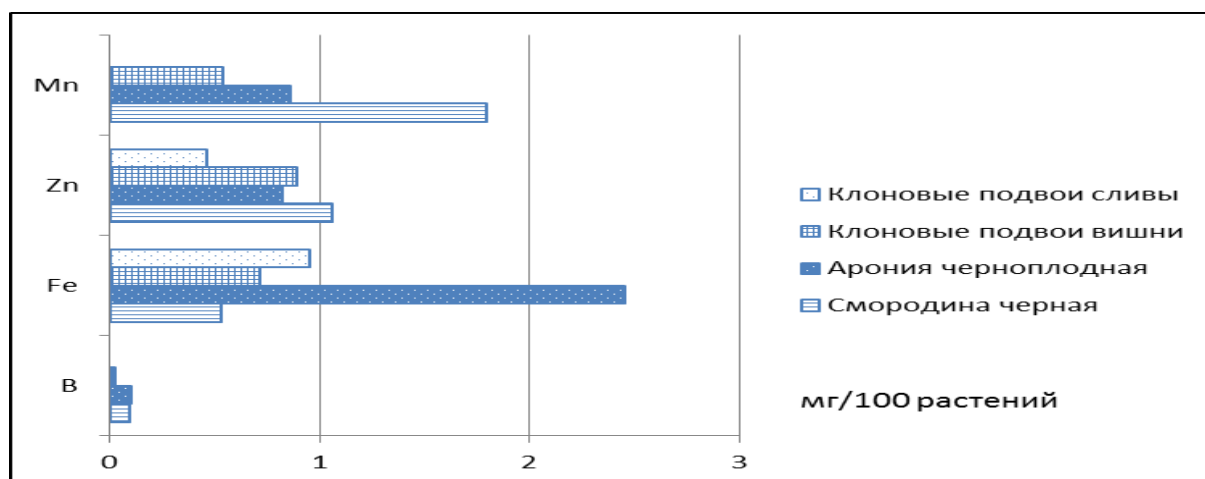


Рисунок 3 – Сравнительное количество микроэлементов, поглощенных различными культурами в течение пассажа микроразмножения и ризогенеза из питательной среды (мг/100 растений-регенерантов).

Показано, что большинство культур в минимальных количествах используют бор (исключение растения-регенеранты смородины на этапе ризогенеза). Из изученных микроэлементов смородина черная максимально потребляет марганец, арония и клоновые подвои сливы – железо, клоновые подвои вишни – цинк, марганец и железо. В таблице приведен порядок (по мере убывания) потребления микроэлементов из питательных сред при культивировании in vitro растений-регенерантов изучаемых культур.

Таблица – Порядок потребления микроэлементов из питательных сред при культивировании in vitro растений-регенерантов, мг

Культура	Микроразмножение	Ризогенез
Смородина черная	Mn, Zn, Fe, B	Mn, Zn, B, Fe
Арония черноплодная	Fe, Mn, Zn, B	Fe, Mn, Zn, B
Клоновые подвои вишни	Zn, Fe, Mn, B	Mn, Zn, Fe, B
Клоновые подвои сливы	Fe, Zn	Fe, Mn, Zn, B

Данные по потреблению микроэлементов из питательных сред при культивировании *in vitro* растений-регенерантов имеют достаточно большую статистическую ошибку по повторностям, что определяет необходимость в дальнейшем использовать для анализа результаты изучения накопления микроэлементов в растениях. Крайне незначительное количество меди, добавляемое в питательную среду, не позволяет диагностировать методом атомно-эмиссионной спектроскопии ее изменения в процессе выращивания растений-регенерантов всех культур, как на этапе микроразмножения, так и на этапе ризогенеза.

ВЫВОДЫ

Установлено, что максимальное количество ионов из искусственной питательной среды потребляют растения-регенеранты смородины черной как в ходе микроразмножения, так и при укоренении. Для исследуемых культур значительно различается потребление обеих форм азота и калия. Потребность в H_2PO_4^- , Mg^{2+} , SO_4^{2-} для культур колеблется незначительно. Соотношение нитратного и аммонийного азота на этапе микроразмножения составляет от 6:1 до 3,2:1; на этапе ризогенеза – от 4,9:1 до 2,9:1. Из изученных микроэлементов смородина черная максимально потребляет марганец, арония и клоновые подвои сливы – железо, клоновые подвои вишни – цинк, марганец и железо.

Литература

1. Arigita, L. Influence of CO_2 and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro* / L. Arigita, A. González, R. Sánchez Tamés // *Physiol Plant.* – 2002. – V.115. – P. 166-173.
2. Arigita, L. 1-Methylcyclopropene and ethylene as regulators of *in vitro* organogenesis in kiwi explants / L. Arigita, R. Sánchez Tamés, A. González // *Plant Growth Regul.* – 2003. – V. 40. – P. 59-64.
3. Kubota, C.T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* *in vitro* under forced and natural ventilation / C. Kubota, T. Kozai // *HortScience.* – 1992. – V. 27. – P. 1312-1314.
4. George, E.F. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories / E.F. George, P.D. Sherrington // Exegetics Ltd, London. – 1984. – 475 p.
5. Schmitz, U. Nutrient uptake in suspension cultures of gramineae. II. Suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.) / U. Schmitz, H. Lörz // *Plant Sci.* – 1990. – V. 66. – P. 95-111.
6. Dantas, A.K. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions / A.K. Dantas [et al.] // *Plant Growth Regul.* – 2001. – V. 33. – P. 237-243.
7. Dussert, S. Nutrient uptake and growth of *in vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) calluses / S. Dussert [et al.] // *Plant Sci.* – 1995. – V. 106. – P. 185-193.
8. Kozai, T. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium / T. Kozai [et al.] // *Plant Cell Tiss Org Cult.* – 1991. – V. 25. – P. 107-115.
9. Moncaleán, P. Nutritional and gibberellic acid requirements in kiwifruit vitroponic cultures / P. Moncaleán [et al.] // *In vitro Cell Dev Biol Plant.* – 2003. – V. 39. – P. 49-55.
10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

MINERAL NUTRITION AND MORPHOGENESIS OF SOME HORTICULTURAL CROPS AT IN VITRO CULTIVATION

N.V. Kukharchik, E.V. Kolbanova, T.A. Krasinskaya, A.M. Malinovskaya,
M.S. Kastritskaya, L.Yu. Tychinskaya, G.D. Poleshko

ABSTRACT

Regenerant plants of horticultural crops grown *in vitro* on agar nutritional media were the objects of the investigation. Ionic chromatography and atomic emission spectroscopy were the methods. The comparative analysis of nutritional elements consumption (NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , H_2PO_4^- , Fe, Mn, Zn, B) from artificial media by regenerant plants of clonal cherry and plum rootstocks and of black currant and Aronia melanocarpa cultivars at micropropagation and risogenesis stages was performed. The structure of ion and element consumption from a nutritional media and their quantitative estimation were determined. The difference in element consumption at cultivars at different stages of *in vitro* cultivation was found out. Regenerant plants of black currant feed the maximum ion quantity from artificial nutritional medium both at a micropropagation stage and at a rooting stage. Consumption of both nitrogen and potassium forms differs significantly for the researched cultures. The demand in H_2PO_4^- , Mg^{2+} and SO_4^{2-} for cultures ranges slightly.

Key words: black currant, Aronia melanocarpa, clonal rootstocks of cherry and plum, mineral nutrition, artificial nutritional media, ionic chromatography, atomic emission spectroscopy, *in vitro* culture, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 01.04.2013