

УДК 634.725:631.533.3:581.143.6:631.811.98

ВЛИЯНИЕ ТРИЙОДБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ НА РАЗВИТИЕ КРЫЖОВНИКА В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Е.В. Колбанова, Н.В. Кухарчик

РУП «Институт плодородства»,

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

e-mail: belhort@it.org.by

РЕЗЮМЕ

Размер культивируемых в условиях *in vitro* растений крыжовника определяется генотипом исходного растения и выбранными для культивирования регуляторами роста и их сочетанием. При этом большим размером обладают растения, культивируемые на среде с содержанием трийодбензойной кислоты (ТИБК) в концентрации 0,5-1,0 мг/л в сочетании с 6-БА в концентрации 0,1-0,2 мг/л, а меньшим – как с добавлением только ТИБК в высокой концентрации 1,5 мг/л, так и в сочетании с 6-БА в двух концентрациях. Низкие концентрации ТИБК в сочетании с 6-БА способствуют образованию большого количества микропобегов в конгломерате, без их истончения и потери интенсивной зеленой окраски, тем не менее, высота микропобегов, получаемая на питательной среде с добавлением этих регуляторов роста, недостаточна для этапа ризогенеза.

Ключевые слова: крыжовник, культура *in vitro*, трийодбензойная кислота, 6-бензиладенин, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Крыжовник относится к культурам, которые с трудом размножаются *in vitro* [1, 2, 3]. Регенерация меристематических верхушек крыжовника и их последующее размножение зависят от многих факторов, в том числе: генотипа, условий культивирования, сроков изоляции экспланта, его размера и положения на материнском растении, сортовых особенностей, минерального и гормонального состава питательной среды.

Немногочисленные исследования особенностей культивирования крыжовника *in vitro* не дают возможности выбрать оптимальный минеральный и гормональный состав питательной среды для микроразмножения сортов. Одни авторы отмечают хорошую регенерацию побегов крыжовника на стандартной питательной среде Мурасиге и Скуга (MS) [2, 4]. Другие авторы указывают, что концентрация солей в питательной среде MS не является оптимальной для культивирования тканей крыжовника. Снижение содержания нитрата калия и нитрата аммония улучшает морфогенез сортов Инвикта и Карлз [3], с уменьшением содержания азота в жидкой среде MS увеличивается регенерационная способность сорта Розовый и уменьшается у сорта Русский [5]. Наши исследования также показали, что среды с полной нормой макросолей по MS непригодны для морфогенеза крыжовника. Снижение содержания в средах нитрата калия и нитрата аммония в 2-3 раза увеличивает регенерационную способность сортов Раволт, Машека, Малахит, Куршу Дзинтарс [6]. Возможно использование на этапе инициации культуры *in vitro* среды Гамборга с добавлением 6-бензиламинопурина (не более 0,5 мг/л), однако, на последующих этапах микроразмножения лучше использовать среду MS, так как на среде Гамборга происходит мельчание побегов [7].

После обработки маточных растений крыжовника физиологически активными веществами за 2-3 недели до введения эксплантов в стерильную культуру регенерационные процессы в культуре *in vitro* протекают активнее (лучше приживаемость при введении в культуру, выше коэффициент размножения, больше выход укоренённых микропобегов, пригодных для пересадки в нестерильные условия) [8, 9].

Ряд авторов отмечают сортовые особенности крыжовника при размножении в стерильной культуре: трудноразмножаемые сорта – Салют, Балет [9], Русский, Сириус [10], достаточно успешно размножаются сорта Ласковый, Грушенька, Альфа 1, Северный капитан [9]. Наши исследования также показали, что сорт Машека обладает высоким морфогенетическим потенциалом в культуре *in vitro* в отличие от сорта Малахит [6].

Одной из проблем на этапе микроразмножения крыжовника является мельчание побегов и невозможность их использования для укоренения. Удлинения микропобегов можно достичь путем их культивирования на среде с добавлением 6-бензиламинопурина в низкой концентрации (0,2 мг/л) как отдельно, так и в сочетании с индолилмасляной (0,1 мг/л) или гибберелловой (0,05 мг/л) кислотами [7]. Добавление аденина к среде позволяло увеличить количество микрочеренков, пригодных для укоренения, у сорта Русский на 22 % и у сорта Юбиляр – на 28 %, в то время как аденин сульфат не стимулировал рост микропобегов [7]. По данным М. Welander (1985), вытягивание микропобегов достигается на среде с добавлением солей по Липуавра без гормонов, причем около 50 % микропобегов формируют корни на этой среде [11].

Цель исследований: изучить влияние экзогенного регулятора роста трийодбензойной кислоты как одной, так и в сочетании с 6-бензиладенином на развитие конгломератов крыжовника в культуре *in vitro*.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2009-2010 гг. Объекты исследований: районированные сорта крыжовника Машека, Куршу Дзинтарс, Северный капитан. Верхушечные и пазушные почки однолетних одревесневших побегов были введены в культуру *in vitro* в фазу полного покоя вегетативных почек (середина октября 2009 г.). В качестве стерилизующего соединения использовали 33%-ную перекись водорода (10 мин) в сочетании с обработками 70%-ным этанолом (1 мин) и 0,5%-ным оксихомом (45 мин). На протяжении 0-, 1-, 2-го пассажей меристематические верхушки культивировали на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением 6-бензиладенина (6-БА) в концентрации 0,3 мг/л для получения достаточного количества конгломератов крыжовника для опыта в 3-м пассаже. В 3-м пассаже конгломераты микропобегов были высажены на модифицированную питательную среду MS с добавлением ингибитора транспорта ауксинов – трийодбензойной кислоты (ТИБК) и 6-БА в различных концентрациях (таблица). Длительность субкультивирования составляла 28 суток. Трийодбензойную кислоту вводили в состав среды совместно с таким сочетанием 6-БА (0,1-0,2 мг/л), которое должно было стимулировать нарастание микропобегов в конгломерате.

Таблица – Состав питательной среды для культивирования крыжовника, мг/л

Компонент питательной среды	Название питательной среды									
	0,5 ТИБК	1,0 ТИБК	1,5 ТИБК	0,5 ТИБК - 0,1 6-БА	1,0 ТИБК - 0,1 6-БА	1,5 ТИБК - 0,1 6-БА	0,5 ТИБК - 0,2 6-БА	1,0 ТИБК - 0,2 6-БА	1,5 ТИБК - 0,2 6-БА	
NH ₄ NO ₃	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	
KNO ₃	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	1/3 MS	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	
KH ₂ PO ₄	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	
Na ₂ ЭДТА	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	
Микросоли	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	
Витамин В ₁	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
Витамины В ₆ , РР	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Витамин С	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
Глицин	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	
Мезоинозит	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
ТИБК	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	0,5	1,0	1,5	
6-БА	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	
Глюкоза, г/л	20									
Агар, г/л	4,8									
рН	5,6-5,7									

Условия культивирования растений *in vitro*: освещение (лампы Phillips ЛД-54, 36 W) – 2,5-3 тыс. лк, температура – плюс 21-23 °С и фотопериод – 16/8 ч.

Статистическую обработку проводили, используя ANOVA, однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ, критерий Дункана при $p=0,05$ для сравнения средних величин в программе *Statistica 6.0*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами ранее исследования по выращиванию сортов крыжовника в культуре *in vitro* показали преимущественное образование конгломератов с короткими микропобегами; такие побеги плохо укореняются на средах для ризогенеза и, соответственно, не позволяют получать адаптированные растения.

При культивировании микропобегов крыжовника на питательной среде с различными регуляторами роста (ТИБК, сочетание ТИБК и 6-БА) установлено достоверное влияние на высоту конгломератов генотипа исходного растения ($p<0,001$), гормонального состава питательной среды ($p<0,01$) и совместное влияние этих двух факторов ($p<0,05$). Увеличение концентрации ТИБК в питательной среде до 1,5 мг/л привело к формированию конгломератов малого размера у всех трёх сортов крыжовника: от 0,61 см у сорта Куршу Дзинтарс до 0,76 см у сорта Северный капитан. Особенно чувствительными к высокой концентрации ТИБК оказались растения-регенеранты сортов

Машека и Куршу Дзинтарс, у которых высота конгломератов на среде с 1,5 мг/л ТИБК в среднем уменьшилась на 0,15 и 0,24 см соответственно по сравнению со средой с добавлением 0,5 мг/л ТИБК. На средах с добавлением ТИБК в низкой концентрации 0,5 и 1,0 мг/л у микропобегов всех трёх сортов высота конгломератов достоверно не отличалась и была не ниже 0,78 см на среде с 1,0 мг/л (сорт Куршу Дзинтарс) и 0,79 см на среде с 0,5 мг/л (сорт Машека) (рисунок 1).

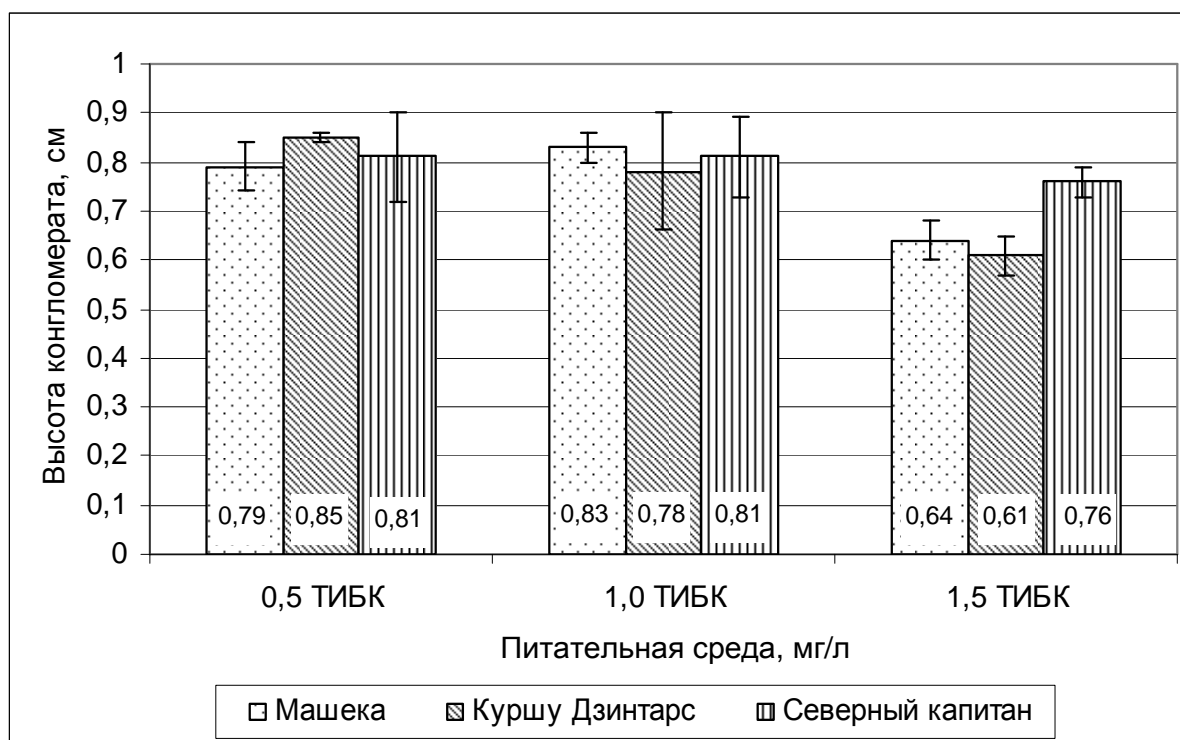


Рисунок 1 – Влияние триодбензойной кислоты на высоту конгломератов микропобегов крыжовника.

Сочетание ТИБК в высокой концентрации (1,5 мг/л) с 6-БА (0,1 мг/л) привело к значительной задержке роста микропобегов сорта Машека: высота конгломератов составила 0,59 см. Максимальная высота конгломерата (0,93 см) у сорта Машека получена на среде с добавлением ТИБК в низкой концентрации (0,5 мг/л) в сочетании с 6-БА в концентрации 0,2 мг/л. У сорта Куршу Дзинтарс высота конгломератов колебалась от 0,71 до 0,93 см в зависимости от варианта среды и достоверно не отличалась друг от друга. У сорта Северный капитан достоверно ниже высота конгломератов была на среде с добавлением ТИБК в концентрации 0,5 мг/л и 6-БА в концентрации 0,2 мг/л (0,79 см) (рисунки 2, 3).

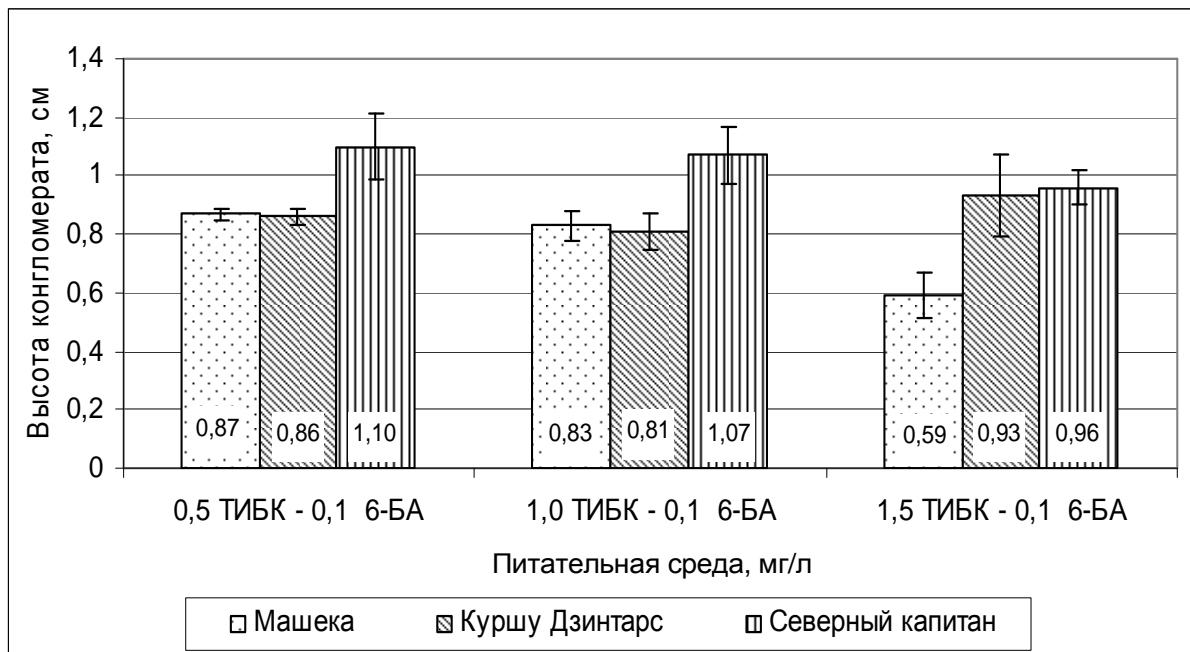


Рисунок 2 – Влияние триодбензойной кислоты и 6-бензиладенина на высоту конгломератов микробегаев крыжовника.

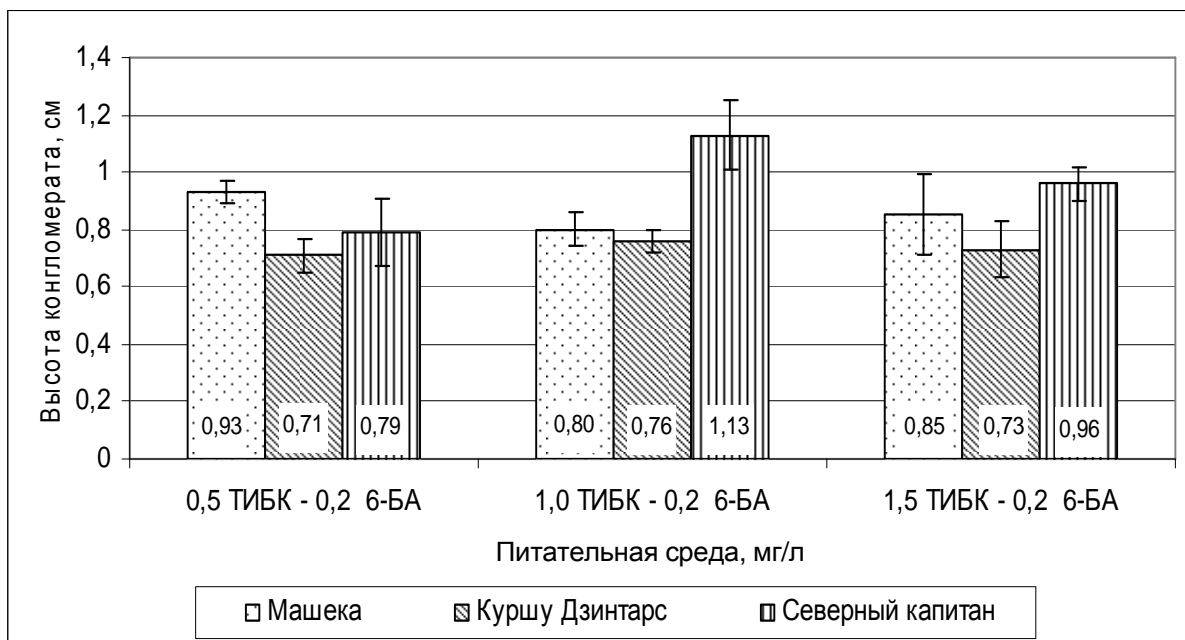


Рисунок 3 – Влияние триодбензойной кислоты и 6-бензиладенина на высоту конгломератов микробегаев крыжовника.

В среднем по всем сортам применение высокой концентрации ТИБК (1,5 мг/л) задерживало рост конгломератов крыжовника. Высота конгломератов составила 0,67 см при минимальном приросте 0,08 см. Использование низкой концентрации ТИБК (0,5 мг/л) в сочетании с 6-БА в концентрации 0,1 или 0,2 мг/л приводило к максимальному приросту конгломератов – 0,19 и 0,21 см. Культивирование конгломератов крыжовника на питательной среде с ТИБК в концентрации 0,5 (или 1,0) мг/л или в сочетании с 6-БА в концентрации 0,1 (или 0,2) мг/л не ухудшало качество микропобегов (толщину и интенсивную зелёную окраску). При культивировании конгломератов на питательной среде с добавлением 1,5 мг/л ТИБК как одного, так и в сочетании с 6-БА в двух концентрациях приводило не только к минимальному росту, но и к истончению микропобегов, потере интенсивной зелёной окраски и образованию каллуса у основания конгломерата (рисунок 4).

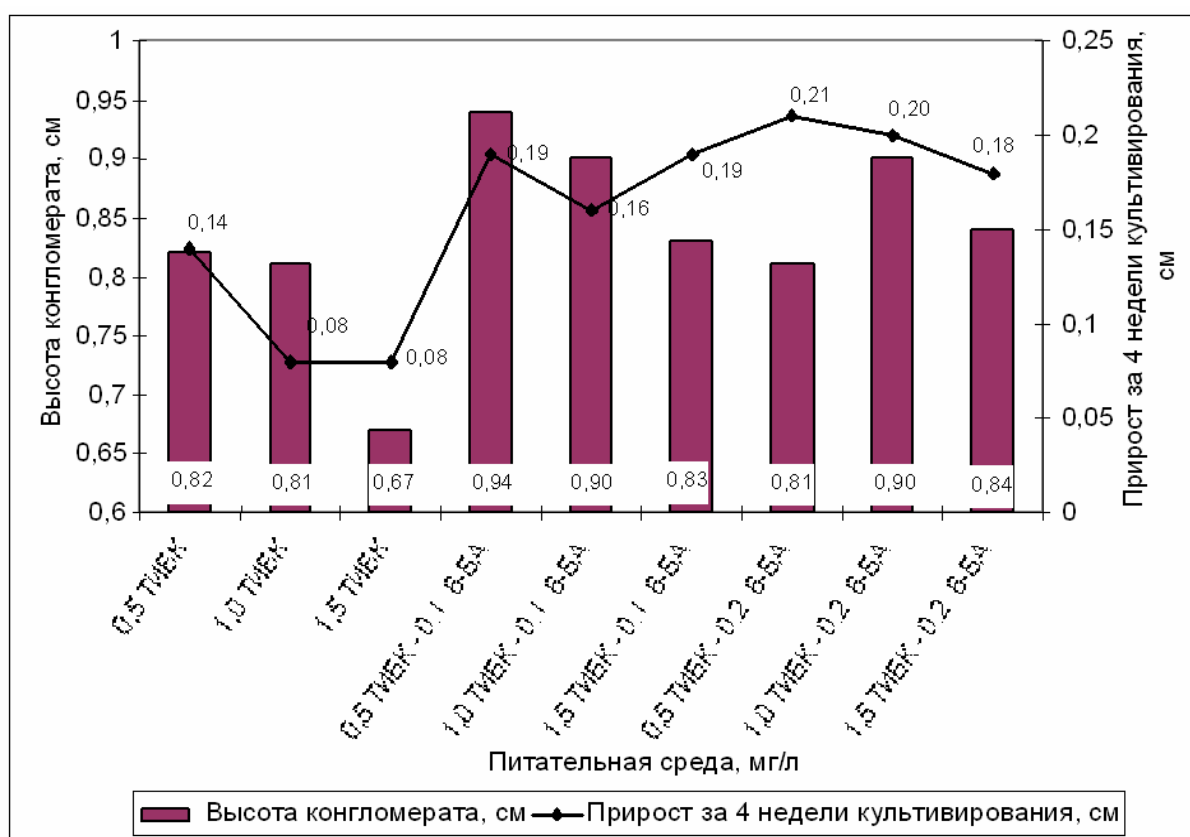


Рисунок 4 – Влияние гормонального состава питательной среды на развитие конгломератов микропобегов крыжовника (в среднем по сортам).

Сорта крыжовника Куршу Дзинтарс и Северный капитан характеризовались максимальным приростом конгломератов – 0,2 и 0,17 см соответственно. Максимальная высота конгломератов (0,93 см) наблюдалась у сорта Северный капитан.

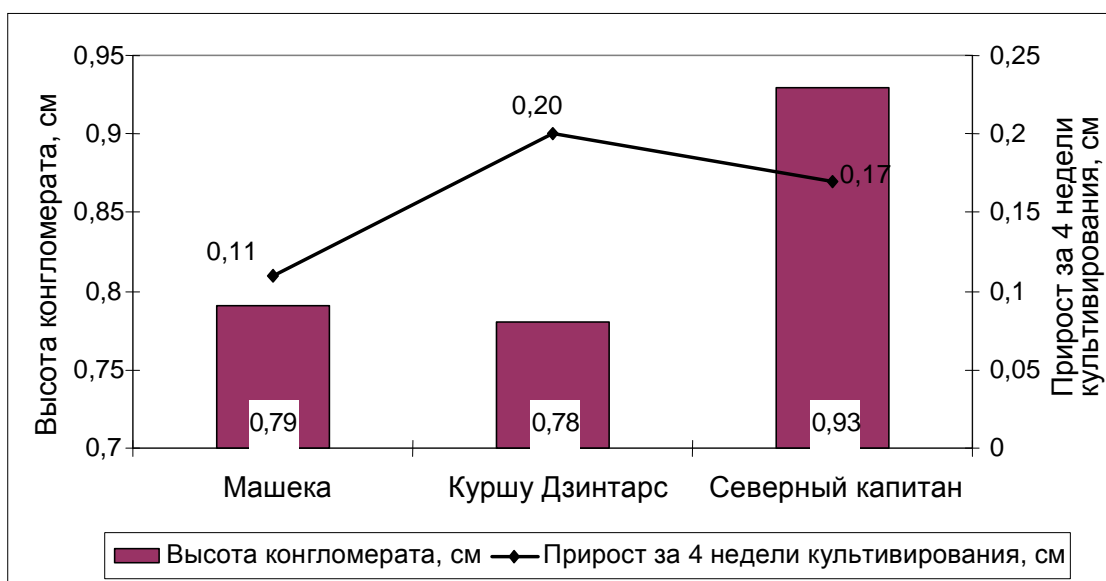


Рисунок 5 – Развитие конгломератов микропобегов крыжовника (в среднем по питательным средам).

Таким образом, размер культивируемых в условиях *in vitro* растений крыжовника определяется генотипом исходного растения, выбранными для культивирования регуляторами роста и их сочетанием. При этом большим размером обладают растения, культивируемые на среде с содержанием ТИБК в концентрации 0,5-1,0 мг/л в сочетании с 6-БА в концентрации 0,1-0,2 мг/л, а меньшим – с добавлением ТИБК в высокой концентрации 1,5 мг/л как одного, так и в сочетании с 6-БА в двух концентрациях. Низкие концентрации ТИБК в сочетании с 6-БА способствуют образованию большого количества микропобегов в конгломерате, без истончения микропобегов и потери интенсивной зеленой окраски. Однако высота микропобегов, получаемая на питательной среде с добавлением этих регуляторов роста, недостаточна для этапа ризогенеза, в связи с чем есть необходимость в проведении дополнительных пассажей для вытягивания микропобегов.

Литература

1. Приходько, Ю.Н. Технология оздоровления крыжовника от вирусов / Ю.Н. Приходько // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. тр. / ВСТИСП; редкол.: В.И. Кашин [и др.]. – М., 1996. – Т. 3. – С. 109-113.
2. Кочетова, Н.И. Особенности регенерации растений крыжовника в условиях *in vitro* / Н.И. Кочетова, Л.В. Алешкевич, Ю.Н. Кочетов // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1981. – № 2 (293). – С. 80-82.
3. Wainwright, H. The micropropagation of gooseberry (*Ribes uva-crispa* L.): I. Establishment *in vitro* / H. Wainwright, A.W. Flegmann // Journal Horticultural Science. – 1985. – Vol. 60. – № 2. – P. 215-221.
4. Миронова, О.А. Микроразмножение крыжовника / О.А. Миронова // Проблемы вегетативного размножения в садоводстве: сб. науч. тр. / Моск. с.-х. акад. им. К.А. Тимирязева; редкол.: А.И. Пупонин (гл. ред.) [и др.]. – М., 1985. – С. 102-106.

5. Афонина, О.А. Влияние состава питательной среды на микроразмножение крыжовника и регенерационную способность пыльников земляники / О.А. Афонина, Л.И. Гаврикова, В.И. Деменко // Удобрения и регуляторы роста в садоводстве: сб. науч. тр. / Моск. с.-х. акад. им. К.А. Тимирязева; редкол.: А.И. Пупонин (гл. ред.) [и др.]. – М., 1984. – С. 101-106.

6. Колбанова, Е.В. Влияние стерилизующих соединений и питательной среды на жизнеспособность и развитие меристематических верхушек сортов крыжовника в культуре *in vitro* / Е.В. Колбанова // Плодоводство: науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства»; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2009. – Т. 21. – С. 252-264.

7. Матушкина, О.В. Клональное микроразмножение плодовых и ягодных культур в системе производства высококачественного материала / О.В. Матушкина, И.Н. Пронина // Научные основы эффективного садоводства: науч. труды / ВНИИС им. И.В. Мичурина; под общ. ред. В.А. Гудковского. – Воронеж: Кварта, 2006. – С. 327-342.

8. Аладина, О.Н. Пикс в ускоренном размножении трудноукореняемых сортов крыжовника / О.Н. Аладина, И.В. Жаркова // Докл. ТСХА. – 1996. – Вып. 267. – С. 132-135.

9. Попова, И.В. Особенности размножения новых слабошиповатых и бесшипных сортов крыжовника / И.В. Попова, О.Н. Аладина, И.В. Жаркова // Докл. ТСХА. – 1998. – Вып. 269. – С. 164-170.

10. Матушкина, О.В. Регенерация растений из изолированных соматических тканей у плодовых и ягодных культур в условиях *in vitro* / О.В. Матушкина // Пути повышения устойчивости садоводства: науч. труды / ВНИИС им. И.В. Мичурина; редкол.: Н.И. Савельев (гл. ред.) [и др.]. – Мичуринск, 1998. – С. 84-86.

11. Welander, M. Micropropagation of gooseberry, *Ribes grossularia* / M. Welander // Sc. hortic. – 1985. – Vol. 26. – № 3. – P. 267-272.

INFLUENCE OF TRIIODOBENZOIC ACID ON GOOSEBERRY IN VITRO DEVELOPMENT

E.V. Kolbanova, N.V. Kukharchik

ABSTRACT

The size of gooseberry plants, cultivated *in vitro*, is defined by a genotype of an initial plant and chosen for cultivating by growth regulators and their combination. Thus the plants, cultivated in a medium with the maintenance of triiodobenzoic acid (TIBA) in concentration of 0.5-1.0 mg/l in a combination with 6-BA in concentration of 0.1-0.2 mg/l, possess larger size. Smaller size is at the plants with only TIBA addition in high concentration of 1.5 mg/l as well as in a combination with 6-BA in two concentrations. Low TIBA concentration in a combination with 6-BA promotes formation of considerable quantity of micro shoots in a conglomerate without their thinning and losses of intensive green colouring. Nevertheless, the height of micro shoots, received in a nutrient medium with addition of these growth regulators, is insufficient for a rhizogenesis stage.

Key words: gooseberry, *in vitro* culture, triiodobenzoic acid, 6-benziladenin, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 25.04.2012