

УДК 634.74:631.533.3:581.143.6:631.82

## СТРУКТУРА ПОТРЕБЛЕНИЯ ЭЛЕМЕНТОВ ПИТАНИЯ РАСТЕНИЯМИ-РЕГЕНЕРАНТАМИ АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ НА ЭТАПАХ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ И РИЗОГЕНЕЗА IN VITRO

Н.В. Кухарчик<sup>1</sup>, М.С. Кастрицкая<sup>1</sup>, А.М. Малиновская<sup>1</sup>,  
Л.Ю. Тычинская<sup>2</sup>, Г.Д. Полешко<sup>2</sup>

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

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

e-mail: malinov\_al@tut.by

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

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

### РЕЗЮМЕ

Вопрос минерального питания растений является очень важным для получения качественного посадочного материала. Хорошей моделью для изучения структуры потребления макроэлементов растениями являются искусственные питательные среды для выращивания *in vitro*, они позволяют полностью контролировать качественный и количественный состав элементов питания, целенаправленно его изменять и оценивать реакцию растений.

В ходе исследования на этапе микроразмножения *in vitro* было выявлено, что растениями-регенерантами аронии черноплодной из питательной среды максимально используется нитратная форма азота ( $\text{NO}_3^-$ ), затем в порядке убывания:  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ .

Соотношение нитратного и аммонийного азота, использованного растениями-регенерантами на этапе микроразмножения, составляет 6:1, на этапе ризогенеза – 3,5:1.

Структура потребления элементов питания растениями-регенерантами аронии черноплодной на этапе ризогенеза следующая (в порядке убывания):  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . При этом, потребление аммонийного азота, калия, серы и фосфора различается несущественно.

Ключевые слова: минеральное питание, арония черноплодная, культура *in vitro*, ионная хроматография, Беларусь.

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных проблем получения высококачественного посадочного материала растений и высоких урожаев является определение потребности различных культур в потреблении минеральных веществ. Потребность в элементах питания отличается не только для разных видов растений, но и меняется в процессе индивидуального развития. Изучение влияния различных минеральных веществ и их концентрации в растении в ходе онтогенеза проводилось на многих культурах. Так, для земляники садовой было отмечено изменение количества азота и кальция при цветении [1-5], выявлено влияние соотношения калия и кальция на цветение роз [6]. Подобные исследования проводились на оливке, табаке и других культурах [7, 8, 9]. Было отмечено не только влияние содержания определенного элемента, но и формы соединения, например, азота в виде нитрата и аммония [9].

Искусственные питательные среды для выращивания плодовых и ягодных растений *in vitro* являются хорошей моделью для изучения структуры потребления макро- и микроэлементов растениями в ходе онтогенеза. Полный контроль качественного и количественного состава питательных сред позволяет определить перечень используемых растениями элементов, а выращивание в изолированном пространстве культуральной емкости – их количество. Полученная информация позволит оптимизировать как питательные среды для культуры *in vitro*, так и минеральное питание растений *in vivo* и с закрытой корневой системой.

Арония черноплодная является удобным объектом исследования в культуре *in vitro* благодаря хорошей регенерационной способности. Кроме того, в настоящее время арония становится популярной и перспективной культурой благодаря высокому содержанию биологически активных веществ (антиоксиданты, витамины) в плодах и их широкому использованию в промышленности в качестве добавок к сокам и красителя [10, 11].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

*Объекты исследований:*

- растения-регенеранты аронии черноплодной на различных этапах культивирования *in vitro*;

- агаризованные питательные среды.

*Методы проведения исследований:*

- биотехнологический (культура апикальных меристем и микроразмножение *in vitro*);  
- физико-химические (система ионной хроматографии ICS-3000 (Dionex, США/Германия).

**Методика культивирования изолированных тканей *in vitro*.**

Порядок подготовки эксплантов. Растительный материал предварительно обрабатывали, удаляли покровные чешуи, почки стерилизовали, выделяли меристему размером до 0,5 мм с помощью бинокулярного микроскопа при увеличении  $\times 12$  и специального набора инструментов. Для культивирования аронии черноплодной использовали минеральный состав питательных сред Мурасиге и Скуга (MS). Стерилизация сред велась при давлении 1 атм. в течение 15 минут.

Условия культивирования растений *in vitro*: освещение – 2,5-3 тыс. люкс, температура – плюс 21-23 °С, фотопериод – 16/8 часов. Длительность субкультивирования – 40 дней. Растения культивировали в пробирках размером 200×22 мм с объёмом питательной среды 10 мл.

Статистическую обработку проводили с использованием ANOVA и критерия Дункана в программе Statistica 6.0.

**Методика пробоподготовки, качественного и количественного анализа элементов в образцах питательных сред с использованием системы ионной хроматографии ICS-3000 (Dionex, США/Германия).**

1. Стекланные пробирки размером 200×22 мм для выращивания растений тщательно моют, промывают дистиллированной водой 3 раза, каждую пробирку (с пробкой) взвешивают и маркируют.

2. Питательную среду наливают в пробирки (по 10 мл), пробирки со средой автоклавируют.

3. Часть пробирок одной партии предназначается для анализа исходных составляющих среды, в оставшиеся пробирки высаживают растения.

4. Через 40 дней (в конце пассажа) анализируют состав питательной среды после пассажа.

5. Расчет использованных элементов проводят в пересчете на вес питательной среды на момент посадки растений-регенерантов (п. 4).

6. Растение осторожно извлекают из пробирки пинцетом, налипший на корни или основание растения субстрат смывают промыванием растения в стакане с подогретой деионизованной водой.

7. Растение выкладывают на фильтровальную бумагу и сушат при комнатной температуре, после чего определяют его вес.

8. Питательную среду максимально полно извлекают из пробирки с помощью деионизованной воды, объем полученного раствора доводят до 100 мл.

9. Шприцем отбирают 2 мл полученного раствора и фильтруют с использованием одноразового шприцевого фильтра (0,45 мкм). Для анализа отбирают 200 мкл фильтрата и разводят деионизованной водой до 2 мл.

10. Виала с подготовленной пробой помещается в автосемплер хроматографа, производится измерение содержания ионов в образце.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введены в культуру *in vitro* апикальные меристемы аронии черноплодной сортов Надзея и Вениса. На первом пассаже коэффициент размножения составил: для сорта Надзея – 8,5, для сорта Вениса – 6,7; на втором пассаже – 6,0 и 9,0; на 3-м пассаже – 10,1 и 8,2, при средней длине побегов 14,1 мм – 21,2 мм соответственно.

Вес воздушно-сухого образца растения-регенеранта аронии после пассажа микро-размножения в среднем составил 41 мг, с колебаниями по отдельным образцам более чем в два раза (от 33 до 72 мг).

Растения-регенеранты аронии черноплодной выращивали на искусственных питательных средах по прописи Мурасиге и Скуга. Составляющие питательные среды макро- и микросоли являлись единственным источником питания растений в пробирках. В одном литре питательной среды на момент высадки микрочеренков растений для размножения в среднем имеется:  $\text{NO}_3^-$  – 2443,9 мг/л;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  – 118,42 мг/л;  $\text{SO}_4^{2-}$  – 167,6 мг/л;  $\text{Cl}^-$  – 212,2 мг/л;  $\text{NH}_4^+$  – 371,25 мг/л;  $\text{K}^+$  – 784,0 мг/л;  $\text{Mg}^{2+}$  – 36,48 мг/л;  $\text{Ca}^{2+}$  – 120 мг/л;  $\text{Na}^+$  – 4,86 мг/л; а так же Fe, B, Zn, Cu, Co, J в количестве от 5,6 до 0,5 мг/л. Для каждой конкретной партии питательной среды для высадки растений-регенерантов проводится контрольный замер концентраций всех элементов питания.

Рассматривая структуру потребления элементов питания из искусственных питательных сред на этапе микроразмножения аронии черноплодной, необходимо отметить, что в массовом отношении максимально используется нитратная форма азота ( $\text{NO}_3^-$ ), затем в порядке убывания:  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . Нитратная форма азота занимает практически 60 % в структуре питания аронии черноплодной на этапе микро-размножения *in vitro*, в то время как аммонийный азот – только 10 %. 10 % в структуре питания аронии *in vitro* составляет калий и около 6 % – фосфор и сера (рисунок 1).

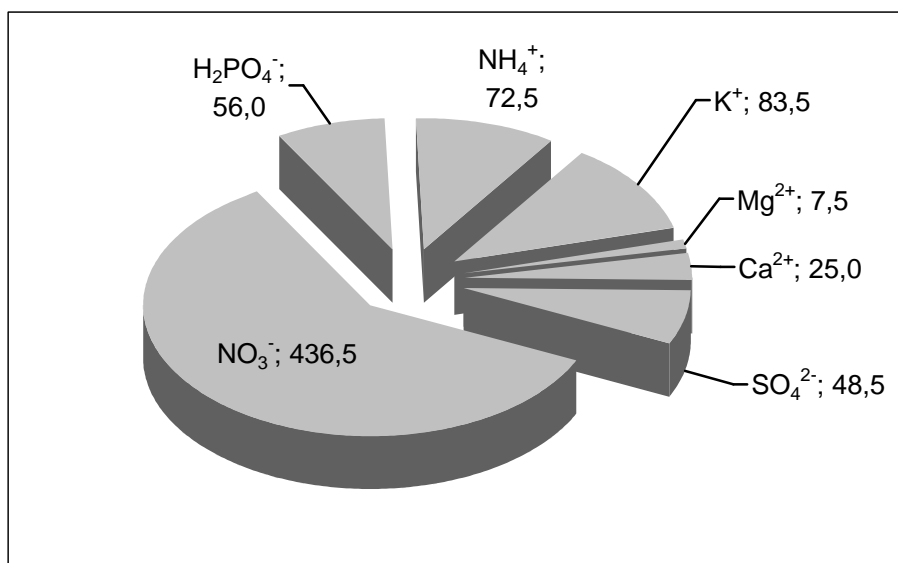


Рисунок 1 – Структура потребления макросолей (в долях от общего потребления элементов, мг/кг) из питательной среды на этапе микроразмножения аронии черноплодной.

На этапе ризогенеза аронии черноплодной вес воздушно-сухого экспланта (укорененного микрорастения) в среднем составил 40 мг, с колебаниями от 20 до 60 мг по отдельным образцам.

Структура потребления элементов питания растениями-регенерантами аронии черноплодной на этапе ризогенеза следующая (в порядке убывания):  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . При этом потребление аммонийного азота, калия, серы и фосфора различается несущественно (рисунок 2). Количество кальция в питательных средах после пассажа ризогенеза практически не изменилось для всех образцов.

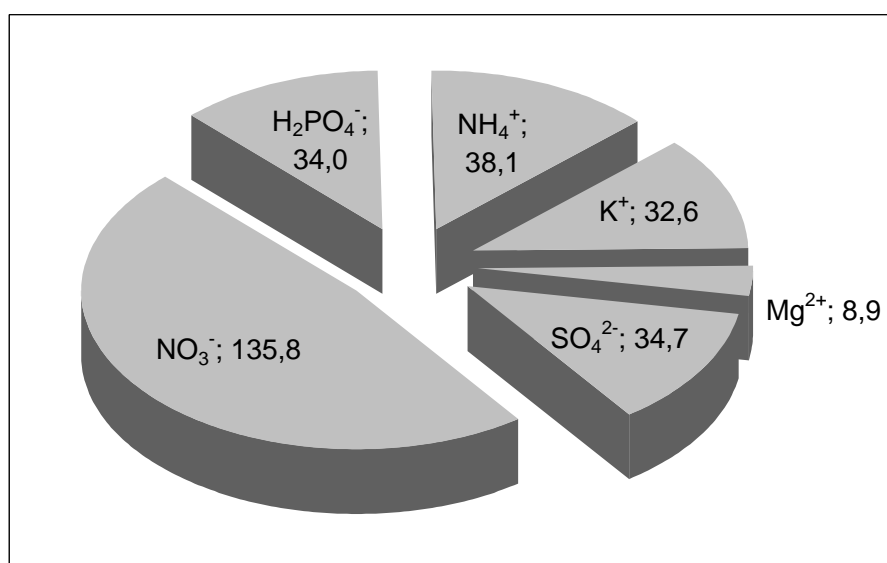


Рисунок 2 – Потребление ионов (мг/кг) из питательной среды на этапе ризогенеза аронии черноплодной.

Исходя из того, что выращивание растений на искусственных питательных средах позволяет точно знать все элементы питания, используемые растениями-регенерантами аронии черноплодной, можно провести сравнительный анализ структуры потребления ионов на этапе микроразмножения и ризогенеза. Принимая за 100 % общее количество используемых ионов, можно утверждать, что основу питания растений-регенерантов на искусственных питательных средах составляет нитратный азот (от 45 % – на этапе ризогенеза, до 60 % – на этапе микроразмножения). Необходимо отметить, что несмотря на то, что нитратный азот, по-прежнему, составляет основу питания растений-регенерантов аронии черноплодной, на этапе ризогенеза существенно изменяется соотношение потребляемых форм азота в сторону увеличения доли аммонийной формы. Соотношение нитратного и аммонийного азота, использованного растениями-регенерантами на этапе ризогенеза, составляет 3,5:1 (на этапе микроразмножения – 6:1; в исходной питательной среде – 6,6:1).

Питательная среда для ризогенеза аронии черноплодной содержит вдвое меньше солей (по прописи Мурасиге и Скуга), чем среда для микроразмножения, что определяет увеличение (в процентах от наличия в питательной среде) потребления большинства ионов, находящихся в питательной среде. В то же время реальное количество использованных растениями-регенерантами ионов (в мг/кг питательной среды) на этапе ризогенеза меньше, чем на этапе микроразмножения (за исключением  $Mg^{2+}$ , использование которого увеличивается в 1,2 раза) (рисунок 3).

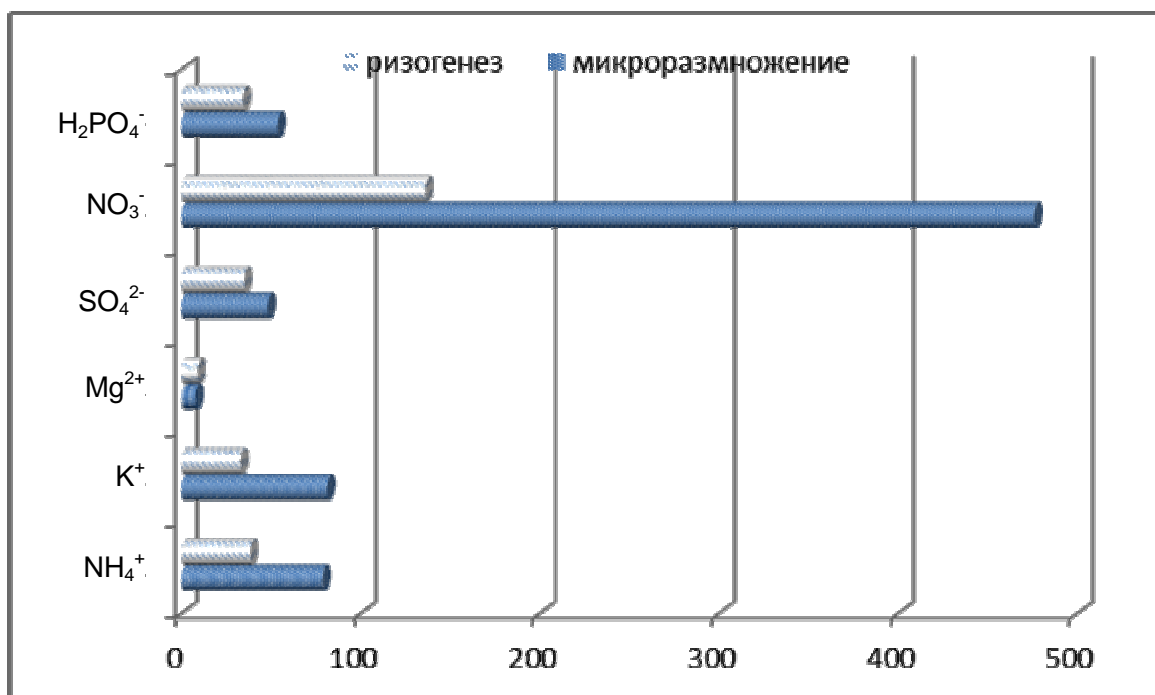


Рисунок 3 – Структура потребления ионов (мг) из питательной среды на этапе микроразмножения и ризогенеза аронии черноплодной.

## ВЫВОДЫ

На этапе микроразмножения *in vitro* растениями-регенерантами аронии черно-плодной из питательной среды максимально используется нитратная форма азота ( $\text{NO}_3^-$ ), затем в порядке убывания:  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ .

Соотношение нитратного и аммонийного азота, использованного растениями-регенерантами на этапе микроразмножения, составляет 6:1, на этапе ризогенеза – 3,5:1.

Структура потребления элементов питания растениями-регенерантами аронии черно-плодной на этапе ризогенеза следующая (в порядке убывания):  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . При этом потребление аммонийного азота, калия, серы и фосфора различается несущественно.

## Литература

1. Eshghi, S. Changes in mineral nutrition levels during floral transition in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) / S. Eshghi, E. Tafazoli // Int. J. Agric. Res. – 2007. – Vol. 2. – P. 180-184.
2. Darnell, R.L. The physiology of flowering in strawberry / R.L. Darnell [et al.] // Hort. Rev. – 2003. – Vol. 28. – P. 352-359.
3. Guttridge, C.G. *Fragaria H ananassa* / C.G. Guttridge // CRC Handbook of Flowering / Halevy, A.H. (Ed.). – 1985. – P. 16-33.
4. Archbold, D.D. Nitrogen availability and fruiting influence nitrogen cycling in strawberry / D.D. Archbold, C.T. Mackown // J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 1997. – Vol. 122. – P. 134-139.
5. Yamasaki, A. Carbon and nitrogen status of flower-induced strawberry as revealed by  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  tracer / A. Yamasaki, T. Yoneyama, F. Tanaka // Acta Hort. – 2000. – Vol. 514. – P. 301-310.
6. Mortensen, L.M. Effects of air humidity and K: Ca ratio on growth, morphology, flowering and keeping quality of pot roses / L.M. Mortensen, C. Ottosen, H.R. Gislerod // Sci. Hort. – 2001. – Vol. 90. – P. 131-141.
7. Salih, U. Determination of endogenous, sugars and mineral nutrition levels during the induction, induction and differentiation stage and their effects on flower formation in olive / U. Salih [et al.] // Plant Growth Regulator. – 2004. – Vol. 42. – P. 89-95.
8. Krajncic, B. Mechanisms of EDDHA effects on the promotion of floral induction in the long-day plant *Lemna minor* (L.) / B. Krajncic, J. Nemeč // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 160. – P. 143-151.
9. Ramage, C.M. Mineral Nutrition and Plant Morphogenesis / C.M. Ramage, R.R. Williams // *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.* – 2002. – Vol. 38, No. 2. – P. 116-124.
10. Тимофеева, В.Н. Плоды аронии черно-плодной – перспективное сырье для комплексной переработки / В.Н. Тимофеева [и др.] // Плодоводство: науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства»; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2007. – Т. 19. – С. 338-343.
11. Шайдек, А. Биологически активные вещества и антиоксидантные свойства плодов и соков из аронии черно-плодной и смородины черной / А. Шайдек, Ю. Боровска, С. Чаплички // Плодоводство: науч. тр. / Институт плодоводства НАН Беларуси; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2004. – Т. 15. – С. 321-325.

**THE STRUCTURE OF MINERAL NUTRITION  
OF *ARONIA MELANOCARPA* ELLIOT. ON MICRO PROPAGATION  
AND RHISOGENES STAGES IN VITRO**

N.V. Kukharchik, M.S. Kastriiskaya, A.M. Malinovskaya,  
L.Yu. Tychinskaya, G.D. Poleshko

**ABSTRACT**

The mineral plant nutrition is vitally important for production of qualitative planting material. The artificial nutrient solutions for *in vitro* cultivating is a good model for structure study of mineral plant nutrition. They allow to control completely the quantitative and qualitative composition of mineral elements as well as to change it aimly and estimate the plant reaction.

In the result of the investigation on *in vitro* propagation stage nitrate ion ( $\text{NO}_3^-$ ) is found to be consumed by aronia regenerant plants in the highest level. It is followed in the order of consumption decrease by  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ .

The correlation between nitrate and ammonium nitrogen used by regenerant plants makes 6:1 on propagation stage and 3.5:1 on rhisogenes one.

Consumption structure of mineral elements by aronia regenerant plants on the rhisogenes stage is the following (in decreasing order):  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . Herewith consumption of ammonium nitrogen, potassium, sulphur and phosphorus differs insignificantly.

Key words: mineral nutrition, aronia melanocarpa, *in vitro* culture, ion chromatography, Belarus.

*Дата поступления статьи в редакцию 22.03.2012*