

УДК 634.222:581.143.6

Н. Н. Коваленко, д.б.н.

Н. И. Медведева, к.с.-х.н.



ФГБНУ «Крымская опытно-селекционная станция Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства», Россия, Крымск, kross67@mail.ru

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭТАПОВ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СЛИВЫ ДОМАШНЕЙ

Аннотация

В статье дан обзор результатов получения посадочного материала с использованием метода клонального микроразмножения с целью усовершенствования технологии получения безвирусного посадочного материала. Опытным путем отработан этап ввода в культуру *in vitro* эксплантов сливы домашней производственного сортимента: Блюфри, Кабардинская ранняя, Кубанская ранняя, Синяя птица и Стенлей. В связи с этим подобраны и оптимизированы составы искусственных питательных сред на основе прописи Мурасиге и Скуга (1962) с учетом специфики вводимых в культуру *in vitro* сортов, а также – для клонального микроразмножения. При этом были учтены показатели приживаемости эксплантов, развития регенерантов и коэффициента размножения. В итоге представлены компоненты основного состава выделенных питательных сред: для ввода в культуру (МС) и клонального микроразмножения (М₂С).

Ключевые слова: сорт, клон, слива домашняя, питательная среда, *in vitro*, ввод в культуру, микроразмножение

UDC 634.222:581.143.6

N. N. Kovalenko, doctor of biological sciences

N. I. Medvedeva, candidate of agricultural sciences

Federal State Budget Scientific Institution "Krymsk Experimental Breeding Station of North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture", Russia, Krymsk, kross67@mail.ru

IMPROVEMENT STAGES CLONAL MICROPROPAGATION OF PLUM

Abstract

The paper reviews the results of obtaining planting material using the method of micropropagation to improve the technology for disease-free planting material. Empirically it worked out in phase I culture of explants *in vitro* plum home production assortment: Blufri, Kabardinskaya rannaya, Kubanskaya rannaya, Sinyaya ptitsa and Stenley. In this regard, the compositions are chosen and optimized artificial nutrient media on the basis of prescription Murashige and Skooga (1962) specific to the input into the culture *in vitro* of varieties, and also – for micropropagation. This took into account indicators of survival explants of regenerated and the multiplication factor. As a result, the components of the basic structure selected nutrient media: to enter into the culture (MS) and micropropagation (M₂C).

Key words: variety, clone, plum, nutrient medium, *in vitro*, entering into the culture, micropropagation

Введение

Закладка промышленных садов сливы домашней оздоровленным посадочным материалом не возможна без использования культуры *in vitro*. Выращивание таких саженцев значительно ограничит распространение вирусных, грибных и бактериальных заболеваний [1, 2, 4, 5, 9]. Это, в свою очередь, даст возможность выращивать в большем объеме экологически чистую продукцию.

Общепризнано, что практически для каждого сорта, вводимого в культуру *in vitro*, требуется индивидуальный подбор состава искусственной питательной среды [3, 4, 6...8, 10]. Исследователями НИИ садоводства нечерноземной полосы, Всероссийского НИИ генетики и селекции плодовых культур, Орловского и Саратовского Госуниверситетов, Института плодородия национальной академии наук Беларуси, Молдовы и других разработана система получения посадочного материала некоторых косточковых плодовых культур, свободного от различных заболеваний [1...10].

Однако, несмотря на серьезные достижения в получении оздоровленного посадочного материала с использованием метода клонального микроразмножения в процессе работы возникает ряд проблем, которые, прежде всего, связаны с индивидуальными особенностями генотипов.

Такие факторы, как состав питательной среды и физические условия культивирования требуют особого внимания т.к. непосредственно влияют на интенсивность размножения и качество побегов пробирочных растений [3, 4, 6, 9]. Разработанные для одного вида растений питательные среды нуждаются в определенных, а иногда значительных изменениях, чтобы обеспечить успешную культуру другого вида [4, 7, 8, 10].

В опытах С. А. Корнацкого (1990) для клонального микроразмножения состав сливы домашней была использована среда Мурасиге и Скуга (1962) с содержанием 6-БАП на этапе ввода в культуру – 0,2 мг/л, а на этапе размножения – 1,0 мг/л. Наибольший коэффициент размножения наблюдался после 3 пассажа и составил для сортов Десертная красная 1 : 28, Память Тимирязева 1 : 31, а у сорта Евразия 21 коэффициент размножения увеличился только после 5-го пассажа в 2 раза [6].

В исследованиях Ц. В. Тутберидзе и В. Н. Михайлюк (1999) при испытании сред: Хеллера, Уайта, Мурасиге и Скуга (1962) – лучшие результаты были получены на последней с содержанием 6-БАП в количестве от 0,1 до 0,3 мг/г. При этом коэффициент размножения у сорта Стенлей был 1 : от 10 до 18, а у Осенней – 1 : от 20 до 30 [10].

В связи с чем необходимо подбирать питательные среды и оптимизировать их состав к определенным сортам сливы домашней.

Цель работы состояла в корректировке питательных сред на этапе микроразмножения *in vitro* сортов сливы домашней, востребованных производством на Кубани.

Материал и методика исследований

Работа проводилась в лаборатории оздоровления и эксплантации растений ФГБНУ Крымской ОСС СКЗНИИСиВ в период с 2012...2015 гг. Растительный материал был получен из отдела генетических ресурсов и селекции плодовых и ягодных культур данной опытно-селекционной станции.

Объектом исследований служили сорта сливы домашней, которые пользуются большим спросом у крупных производителей товарной продукции и садоводов любителей Кубани: Стенлей, Кубанская ранняя, Кабардинская ранняя, Синяя птица и Блюфри.

В работе руководствовались методическими рекомендациями Ю. Г. Попова (1979). Для уточнения интенсивности размножения эксплантов *in vitro* определяли коэффициент размножения по формуле $K_f=1:N$, где N – количество микропобегов в одном конгломерате.

Результаты и их обсуждение

Для ввода в культуру *in vitro* использовался модифицированный вариант питательной среды Мурасиге и Скуга (1962) (МС), подобранный в ходе проведения наших исследований (таблица 1).

Таблица 1 – Состав искусственной питательной среды для ввода в культуру *in vitro* эксплантов сливы домашней

Компоненты питательной среды	Среда МС, мг/л
Основной состав	по прописи
Витамины	В1 – 0,4; В6 – 0,4; РР – 0,2; С – 1,5; инозит – 100
Аминокислоты	глицин – 4,0
Фитогормоны	6БАП – 0,5; ГК – 0,1

Как показали результаты учета приживаемости эксплантов, данный состав питательной среды оказался эффективным для всех испытываемых сортов сливы домашней (таблица 2).

Таблица 2 – Приживаемость эксплантов сливы *in vitro* на среде МС

Сорт	Приживаемость эксплантов, %
Блюфри	90,0
Кабардинская ранняя	80,0
Синяя птица	85,0
Стенлей	95,0

Судя по приведенным данным, наиболее высокая приживаемость эксплантов была у сортов Стенлей и Блюфри и составила соответственно, 95 и 90%. Несколько ниже на 10...15 % этот показатель был у сортов Синяя птица и Кабардинская ранняя – 85 и 80%, соответственно.

На этапе клонального микроразмножения испытывалось 2 варианта питательной среды Мурасиге и Скуга (таблица 3).

Таблица 3 – Состав питательных сред для клонального микроразмножения сортов сливы *in vitro*

Компоненты питательной среды	Питательная среда	
	М ₂ С, мг/л	М ₂ В, мг/л
Основной состав	по прописи (сахароза 30 г/л)	по прописи (сахароза 20 г/л)
Витамины	В1 – 0,4; В6 – 0,4; РР – 0,2; С – 1,0; инозит – 100,0	В1 – 0,5; В6 – 0,5; РР – 0,5; С – 1,0; инозит – 100,0
Аминокислоты	глицин – 1	
Фитогормоны	6БАП – 0,5; ИМК – 0,01	6БАП – 0,1; ИМК – 0,001; ГК – 0,2

Оценка результатов опыта выявила различия в росте и развитии регенерантов у оздоравливаемых сортов сливы домашней на испытываемых средах (таблица 4). Интенсивность развития конгломератов определялась по занимаемой им площади на поверхности агара в пробирке (см. примечание).

Таблица 4 – Влияние состава питательных сред на развитие регенерантов сортов сливы в условиях *in vitro* (3 пассаж)

Сорт	Развитие регенерантов на питательной среде	
	M ₂ B	M ₂ C
Блюфри	++	+++
Кабардинская ранняя	+	++++
Кубанская ранняя	++	+++
Синяя птица	++	++++
Стенлей	++	+++

Примечание: + – очень слабое развитие (1/5...1/6 часть среды); ++ – слабое развитие (1/4...1/3 часть); +++ – умеренное развитие (1/3...1/2 часть); ++++ – хорошее развитие (2/3 и более)

Данные свидетельствуют о том, что для клонального микроразмножения сортов сливы домашней оптимальным был состав среды M₂C. Поскольку на этой среде у всех опытных сортов отмечено хорошее развитие конгломератов. Высота побегов в них составила от 1,5 до 2 см. Площадь конгломерата побегов в поперечном сечении закрывал практически всю поверхность среды в пробирке. В то же время на среде M₂B были отмечены слабый рост и развитие меристем у данных сортов сливы, особенно – Кабардинской ранней.

При определении коэффициента размножения также наблюдалась существенная разница между вариантами опыта по данному показателю (таблица 5).

Таблица 5 – Влияние состава питательных сред на коэффициент размножения сортов сливы *in vitro*

Сорт	Коэффициент размножения на питательной среде			
	M ₂ B		M ₂ C	
	средний	максимальный	средний	максимальный
Блюфри	1:5,6	1:6,0	1:18,2	1:22,0
Кабардинская ранняя	1:4,3	1:5,0	1:10,3	1:16,0
Кубанская ранняя	1:5,9	1:7,0	1:12,4	1:14,0
Синяя птица	1:6,7	1:8,0	1:20,6	1:25,0
Стенлей	1:8,5	1:10,0	1:15,8	1:20,0

В опыте коэффициент размножения как средний, так и максимальный у всех сортов сливы был выше на среде M₂C, примерно в три раза, чем на среде M₂B. Полученные данные так же свидетельствуют о том, что состав питательной среды M₂C является оптимальным для клонального размножения сортов сливы домашней. Прослеживается разница в способности к размножению в культуре *in vitro* среди оздоравливаемых сортов сливы домашней. Она заключается в том, что активнее других размножались регенеранты сортов Синей птицы, Блюфри и Стенлея, у которых среднее значение коэффициента размножения составило 1:20,6; 1:18,2; 1:15,8 при максимальном – 1:25; 1:22; 1:20, соответственно. У сортов Кабардинская ранняя и Кубанская ранняя эти показатели были практически в два раза ниже и составили 1:10,3; 1:12,4 и 1:16; 1:14, соответственно.

Выводы

В результате исследований отработан и оптимизирован состав искусственной питательной среды на основе прописи Мурасиге и Скуга (1962) для этапов ввода в культуру *in vitro* и клонального микроразмножения. Выявлено, что экспланты всех испытываемых сортов сливы домашней достаточно хорошо приживаются на подобранной среде (МС) и хорошо развиваются на среде – М₂С. Это значительно повышает эффективность работ по клональному размножению и дает возможность ускоренного получения оздоровленных сортов сливы домашней для маточных насаждений.

Литература

1. Абраменко, Н.М. О новом методе обеззараживания растений, пораженных вирусами / Н.М. Абраменко // Тр. Молд. НИИ садоводства, виноградарства и виноделия. – Кишинев, 1961. – Т. 18. – С. 49.
2. Бленда, А.В. Получение элиты косточковых культур с применением микроклонирования / А.В. Бленда, А.А. Сазонов // Науч. основы устойчив. садоводства в России: (докл. конф. 11-12 марта 1999 г.). – Мичуринск, 1999. – С. 374-376.
3. Бутенко, Р.Г. Использование культуры тканей растений в сельскохозяйственной науке и практике / Р.Г. Бутенко // С.-х. биология. – 1979. – №3. – С. 306-315.
4. Высоцкий, В.А. Культура изолированных тканей и органов плодовых растений: Оздоровление и микроклональное размножение / В.А. Высоцкий // С.-х. биология. – 1983. – №7. – С. 42-48.
5. Капица, О.С. Оздоровление вегетативно размножаемых растений от вирусных болезней / О.С. Капица, Э.Н. Андреева // Экспериментальные работы по генетике микроорганизмов и вирусологии растений. – М., 1965. – С. 35.
6. Корнацкий, С.А. Микроразмножение сортов сливы / С.А. Корнацкий // Проблемы интенсификации современного садоводства. – Мичуринск, 1990. – С. 164-165.
7. Матушкина, О.В., Клональное микроразмножение плодовых и ягодных культур и перспективы его использования / О.В. Матушкина, И.П. Пронина // Основные итоги и перспективы научных исследований ВНИИС им. И.В. Мичурина (1931-2001 гг.): сб. науч. тр. – Тамбов, 2001. – С. 103-105.
8. Муратова, С.А. Особенности введения в культуру *in vitro* плодовых и ягодных растений // Плодоводство / ИП НАН Беларуси. – Самохваловичи, 2005. – Т.17. – Ч.2. – С. 182-184.
9. Подорожный, В.Н. Ускоренное внедрение в производство алычи и новых клоновых подвоев косточковых плодовых культур с использованием биотехнологических методов / В.Н. Подорожный // Совершенствование сортимента и технологии возделывания косточковых культур: тез. – Орел: ВНИИСПК, 1998. – 182-184.
10. Тутберидзе, Ц.В. Особенности микроразмножения сливы *in vitro* / Ц.В. Тутберидзе, В.Н. Михайлюк // Материалы междунар. науч.– практ. конф. «Садоводство и виноградарство 21 века»; Краснодар, 7-10 сентября 1999 г. / ВНИИСиВ. – Краснодар, 1999. – Ч.3. – С. 103-104.

References

1. Abramenko N.M. (1961): Approaching to a new method of disinfection of plants affected by viruses. Proc. of the Moldavian Research Institute of Horticulture, Viticulture and Winemaking, **18**: 49. (in Russian).

2. Blenda A.V., Sazonov A.A. (1999): Stone fruit elite obtaining with the application of micro clone culture. In: Proc. Conf. Scientific basis of stable horticulture in Russia. Michurinsk: 374-376. (in Russian).
3. Butenko R.G. (1979): The use of culture of plant tissues in the agricultural science and practice. Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural biology], **3**: 306-315. (in Russian).
4. Vysotskiy V.A. (1983): Culture of isolated tissues and organs of fruit plants: assanation and micro clonal propagation. Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural biology], **7**: 42-48. (in Russian).
5. Kapitsa O.S., Andreeva E.N. (1965): Assanation of vegetatively propagated plants from virus diseases. In: Experimental works on genetics of micro organisms and virology of plants. Moscow: 35. (in Russian).
6. Kornatskiy S.A. (1990): Micro propagation of plum varieties. In: Problems of the intensification of the contemporary fruit-growing. Michurinsk: 164-165. (in Russian).
7. Matushkina O.V., Pronina I.P. (2001): Clonal micro propagation of fruit and berry crops and prospects of its using. In: The basic results and prospects of scientific investigations of I.V. Michurin's VNIIS (1931-2001). Tambov: 103-105. (in Russian).
8. Muratova S.A. (2005): The peculiarities of entering culture in vitro of fruit and berry plants. Plodovodstvo [Fruit growing], **17**(2): 182-184. (in Russian).
9. Podorozhnyy V.N. (1998): Accelerated introduction of cherry plum and new clone rootstocks of stone fruit crops into production with the application of biotechnological methods. In: The improvement of stone fruit assortment and technology of cultivation. Orel, VNIISPK: 182-184. (in Russian).
10. Tutberidze Ts.V., Mikhaylyuk V.N. (1999): The peculiarities of plum micro propagation in vitro. Horticulture and viniculture of the 21 century. In: Proc. Int. Conf. Horticulture and viticulture in 21 century, **3**:103-104. (in Russian).