

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ ЧЕРЕШНИ (*PRUNUS AVIUM* L.)

Н.В. КУЗНЕЦОВА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Черешня (*Prunus avium* L.) относится к числу экономически важных плодовых культур в Украине. Одной из главных проблем ее выращивания является внезапная гибель плодоносящих деревьев. На сегодня существует две серьезные причины этого. Первая – несовместимость подвоя с привоем [9]. Вторая, не менее важная причина, – это высокая степень поражения промышленных насаждений черешни вирусными, бактериальными и грибными болезнями. Решить первый вопрос можно было бы выращиванием черешни на собственных корнях. Однако, основываясь на литературных данных и исследованиях, выполненных в НБС–ННЦ (г. Ялта) на сортах Валерий Чкалов, Крупноплодная, Бигарро-Бурлат, Мелитопольская Черная, Сказка и других, можно считать, что черешня имеет низкую способность к ризогенезу как в условиях *ex situ*, так и *in vitro* [7-9, 11]. Рассматривая второй вопрос, следует отметить, что в южных регионах Украины, в том числе Крыму, на черешне выявлены наиболее вредоносные болезни, причиняющие значительный экономический ущерб плодоводству: скручивание листьев черешни (CLRV), мозаика резухи (ArMV), черная кольцевая пятнистость томатов (TBRV) [4, 5]. Поэтому одним из эффективных способов получения здоровых корнесобственных сортов являются методы биотехнологии, которые позволяют значительно сократить сроки получения полноценных растений и повысить эффективность размножения в условиях *in vitro* по сравнению с традиционными методами. Несмотря на то, что первые положительные результаты культивирования *in vitro* косточковых плодовых растений рода *Prunus* на примере сливы (сорт Pandora) были получены более 40 лет назад, многие вопросы клонального микроразмножения, такие как подбор питательных сред, установление эффективных концентраций регуляторов роста, введение и культивирование эксплантов, регенерация *in vitro*, до сих остаются недостаточно изученными.

Цель настоящего исследования – испытать составы питательных сред и выявить оптимальные из них для разных этапов морфогенеза, определить соотношение и концентрации регуляторов роста, способствующих повышению коэффициента размножения микропобегов и ризогенеза черешни (*P. avium*) для разработки клонального микроразмножения.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали сорта черешни с разными сроками созревания плодов: Рубиновая Ранняя, Сказка, Талисман, Анонс, Валерий Чкалов, Крупноплодная, Бигарро-Бурлат, Мелитопольская Черная, произрастающие в коллекционных насаждениях степного отделения НБС–ННЦ (п. Гвардейское, АР Крым) и в опытном хозяйстве «Мелитопольское» Института орошаемого садоводства им. Н.Ф. Сидоренко (г. Мелитополь). В исследованиях применяли как общепринятые, так и разработанные в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС–ННЦ методы [1-3]. Опыты проводились в 2006-2008 гг. Экспланты помещали на поверхность агаризированной питательной среды в условиях ламинарного бокса Fatran Lf. Микропобеги культивировали на питательных средах Gamborg и Eveleigh (B5) [6], Quoirin и Leroivte (QL) [10], в нашей модификации, и средах PS, Зу, Уч4, Чу4, Чу3,

разработанных в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС–ННЦ. Для изучения морфогенетических потенций органов и тканей в питательную среду добавляли 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрациях 1,0-4,4 мкМ, гибберелловую кислоту (ГК₃) – 0,15-2,89 мкМ, β-3-индолилмасляную кислоту (ИМК) – 2,46-7,35 мкМ и α-нафтилуксусную кислоту (НУК) – 1,34-8,06 мкМ. Пробирки с эксплантами помещали в культуральную комнату с заданным режимом интенсивности освещения (2,0-2,5 клк), 16-часовым фотопериодом и температурой 24±1°C.

Результаты и обсуждение

Для снятия апикального доминирования и индукции образования множественных адвентивных микропобегов питательные среды PS, B5 и QL дополняли БАП и ГК₃ в концентрации 1,0-4,4 мкМ и 0,44-2,89 мкМ соответственно. Появление адвентивных микропобегов отмечали через 25-30 суток культивирования эксплантов на питательных средах PS и B5 с добавлением 1,0-2,22 мкМ БАП и 1,44-2,89 мкМ ГК₃ (рис. 1).



**Рис. 1. Образование дополнительных почек сорта Сказка на среде PS с ГК₃:
а – конгломерат микропобегов; б – разделенные микропобеги**

На питательной среде PS, содержащей 1,0-2,22 мкМ БАП и 0,44-1,44 мкМ ГК₃, микропобеги развивались через 40-60 суток культивирования. Образовавшиеся конгломераты микропобегов, высота которых достигала 0,4-0,6 см, а длина листьев не превышала 0,3-0,4 см, имели шаровидную форму.

Установлено, что с увеличением числа пассажей (до 6) коэффициент размножения возрастал. Дальнейшее пассирование приводило к постепенному угасанию процесса массового побегообразования. Однако на микропобегах, предварительно регенерировавших на питательной среде с низкими концентрациями регуляторов роста, при повторном пассаже на среду, содержащую БАП и ГК₃, вновь формировались дополнительные микропобеги (табл. 1).

Таблица 1

Зависимость коэффициента размножения микропобегов черешни сорта Сказка от длительности их культивирования и концентрации БАП и ГК₃ в питательной среде

Номер пассажира	Концентрация регуляторов роста (мкМ) и их соотношение		Коэффициент размножения
	БАП	ГК ₃	
2-3	1,0-2,22	0,44-1,44	1:6 – 1:7
4-5	2,22-4,44	1,44-2,89	1:8 – 1:9
6-7	1,0-2,22	0,44-1,44	1:3 – 1:1
8-9	1,0	0,15	0
10-11	1,0	0,15	1:1
12-13	1,0-2,22	0,44-1,44	1:1 – 1:2
14-15	1,0-2,22	0,44-1,44	1:3 – 1:5

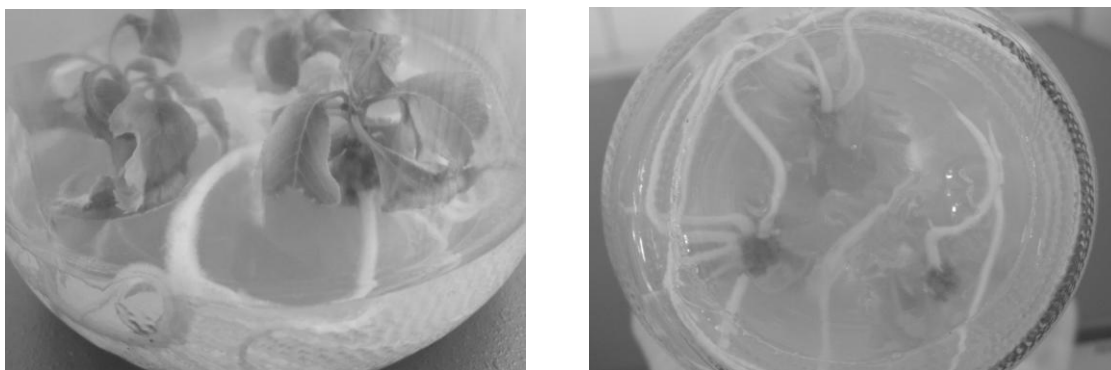
Коэффициент размножения у сорта Сказка составлял 1:6–1:8. Значительно ниже он был отмечен у сортов Рубиновая Ранняя и Талисман – 1:2–1:3.

Установлено, что увеличение концентрации БАП и ГК₃ (до 4,44 и 2,89 мкМ соответственно) способствовало интенсивной закладке дополнительных почек. Однако 10-35% сформированных на этой питательной среде адвентивных микропобегов не развивались. Кроме того, такое соотношение регуляторов роста приводило к оводнению тканей у эксплантов сортов Рубиновая Ранняя, Анонс и Талисман.

Снижение концентрации БАП в питательной среде до 1,0 мкМ и ГК₃ до 0,15 мкМ уменьшало количество адвентивных микропобегов и способствовало их удлинению.

Проведенные опыты по черенкованию микропобегов в условиях *in vitro* показали, что сегменты с 1-2 междоузлиями продолжали развиваться на питательной среде PS, содержащей 1,0-2,22 мкМ БАП и 0,44-0,73 мкМ ГК₃. Сегмент, изолированный с верхушечной (апикальной) части микропобега, регенерировал, вытягиваясь в длину. При этом на сегменте, взятом с базальной части побега, наблюдалось образование адвентивных микропобегов в соотношении 1:1–1:4. На питательных средах B5, QL и PS, дополненных 2,22-4,44 мкМ БАП и 0,44-1,44 мкМ ГК₃, сегменты не развивались. Также выявлено, что развитие эксплантов черешни исследуемых сортов (вытягивание в длину, увеличение размеров листовой пластинки) на питательной среде QL происходило медленнее по сравнению с вышеуказанными питательными средами.

Для индукции ризогенеза микропобеги длиной 1,6-2,2 см помещали на поверхность агаризированной среды, не содержащей БАП и ГК₃. Из испытанных 4 составов питательных сред Зу, Уч4, Чу4, Чу3 успешное укоренение происходило на питательной среде Чу3 с добавлением ИМК в концентрации 2,46-7,35 мкМ и НУК 1,34-8,06 мкМ. Появление первых корней (до 6 штук) на регенеранте наблюдали у сортов Сказка, Валерий Чкалов и Талисман на 20-35 сутки культивирования (рис. 2).



а

б

**Рис. 2. Ризогенез микропобегов черешни in vitro:
а - регенеранты черешни с развитой корневой системой;
б – развитая корневая система (вид снизу)**

Вместе с тем, на среде ЧуЗ, одновременно с развитием корней, отмечено увядание верхних листьев, отмирание верхушечной части регенеранта.

Спустя 28-40 суток культивирования у регенерантов формировалась нормально развитая корневая система. Такие растения высаживали в стерильный субстрат на адаптацию в условия in vivo.

Выводы

Таким образом, экспериментально установлено соотношение ГК₃ и БАП в питательной среде, их сочетание и концентрации, индуцирующие множественное адвентивное побегообразование черешни исследуемых сортов в культуре in vitro. Лучшие результаты регенерации микропобегов были получены на питательных средах PS и B5, дополненных 2,22-4,44 мкМ БАП и 0,73-2,16 мкМ ГК₃. В результате изучения ризогенеза выявлена зависимость корнеобразования от регуляторов роста, а также от генотипа исходного растения-донора.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука., 1964. – 272 с.
2. Калинин Ф.Л. Технология микроклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сарнацкая. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.
3. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур / Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. // Труды Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 189-199.
4. Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений in vitro / Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Ежов В.Н. и др. // Тр. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91 – С. 111-120.
5. Вирусы, поражающие косточковые плодовые культуры, и биотехнологические пути создания устойчивых форм / Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Митрофанова И.В., Кузнецова Н.В. // Біоресурси та віруси: V Міжнар. конф. Київ, 10-13 верес. 2007 р. – Київ: Фітосоціоцентр, 2007. – С. 182.
6. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – Vol. 46. – № 5. – P. 417-421.
7. Gregor Osters, Luthar Zlata, Stampak Franci. The importance of the sterilization proceducing vigorous cherry plants (*Prunus sp.*) in vitro // Acta agriculturae slovenica. – 2004. – Vol. 83. – P. 45-51.

8. Sauer Annemarie. In vitro – Vermehrung verschiedener genotypen von *Prunus avium* L. // Gartenbauwissenschaft. – 1983. – Bd. 48. – S.124-127.
9. Snir Iona. In vitro micropropagation of sweet cherry cultivars // Hort. Science. – 1982. – Vol. 17. – № 2. – P. 735-736.
10. Quoirin M., Lepoivre Ph. Etude de milieux adaptés aux cultures in vitro de *Prunus* // Acta Hort. – 1977. – Vol. 78. – P. 437-442.
11. Yang H. Einflub verschiedener Auxine auf die in vitro – Bewurzelung von Subkirschen // Gartenbauwissenschaft. – 1994. – Bd. 59. – S. 45-47.

Рекомендовано к печати д.б.н., проф. Митрофановой О.В.