

РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РИЗОГЕНЕЗ МИКРОПОБЕГОВ ЧЕРЕШНИ (*PRUNUS AVIUM* L.) *IN VITRO*

Н.В. КОРЗИНА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Биотехнология находит все более широкое применение в различных отраслях сельского хозяйства, и, в частности, в плодоводстве. Так, в условиях *in vitro* успешно проводят селекцию косточковых плодовых культур [4, 11]. Сочетание с методами термотерапии и хемотерапии позволяет оздоравливать ценный посадочный материал от вирусной и грибной инфекции [3, 5, 6] и массово тиражировать трудноразмножаемые виды растений [1, 2], что является особенно актуальным для культур с низкой способностью к ризогенезу [18, 19].

В последние годы получены положительные результаты микроразмножения *in vitro* ряда растений, в том числе плодовых, таких как вишня, слива, алыча, персик, абрикос, черешня [6–10, 12–14, 16]. Однако многие вопросы, такие как влияние регуляторов роста, их концентрации и соотношения в питательных средах для основных этапов культивирования, до сих пор малоизучены. Известно, что черешня является одним из наиболее трудноукореняемых видов рода *Prunus* и обладает низкой способностью к размножению черенками [15, 18, 19]. Поэтому цель данной работы – установить регуляторы роста и их эффективные концентрации в питательной среде.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали сорта черешни с разными сроками созревания плодов, такие как Сказка и Талисман, произрастающие 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 [2, 3]. Опыты проводились в 2008–2009 гг. Микропобеги культивировали на питательной среде Murashige и Skoog (1962) [18] и в наших модификациях: Су, Су1–Су6, Су (ИУК). Для изучения морфогенетических потенций органов и тканей в питательную среду добавляли следующие регуляторы роста: β -3 –индолилмасляную кислоту (ИМК) – 2,46–7,35 мкМ, α -нафтилуксусную кислоту (НУК) – 5,37–10,74 мкМ, индолилуксусную кислоту (ИУК) – 2,85–5,71 мкМ. Пробирки с микропобегами помещали в культуральную комнату с заданным режимом (интенсивность освещения 2,0–2,5 клк, 16 часовой фотопериод и температура $24 \pm 1^\circ\text{C}$).

Результаты и обсуждение

Как известно, завершающим этапом клонального микроразмножения *in vitro* является формирование корневой системы. Для индукции ризогенеза микропобеги длиной 1,0–2,0 см помещали на поверхность агаризированной среды, дополненной ауксинами в разных концентрациях и соотношениях. Появление первых корней на регенерантах сорта Сказка наблюдали на питательной безгормональной среде (контрольном варианте) через 28 суток культивирования. Из испытанных составов питательных сред успешное укоренение происходило через 18 суток развития на питательных средах с добавлением 5,71 мкМ ИУК и 10,74 мкМ НУК соответственно (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние комбинаций и концентраций ауксинов в питательной среде на
ризогенез микропобегов черешни сорта Сказка**

Концентрация ауксинов, мкМ			Исходное количество микропобегов, шт.	Время культивирования, сутки	Количество микропобегов, %	
ИМК	НУК	ИУК			укоренив.	не укорен.
0	0	0	9	28	33,3	66,7
9,80	0	0	18	22	16,7	83,3
4,90	5,37	0	16	24	18,8	81,2
0	10,74	0	16	18	43,8	46,2
19,6	0	0	12	31	8,3	91,7
9,80	10,74	0	12	30	25	75
0	0	5,71	8	18	37,5	62,5

Вместе с тем, одновременно с развитием корней отмечено увядание верхушечных листьев, отмирание апикальной части регенеранта, сильное разрастание каллуса.

Повышение концентрации ИМК в питательной среде замедляло формирование и рост корней. Так, на питательных средах с добавлением 9,80 мкМ ИМК и с 4,90 мкМ ИМК и 5,37 мкМ НУК корни развились через 22–24 суток культивирования. На питательных средах, содержащих 9,80 мкМ ИМК, 10,74 мкМ НУК, и 19,6 мкМ ИМК, корни появились через 30 суток. Таким образом, наиболее эффективными для ризогенеза микропобегов черешни являются питательные среды, содержащие 5,37–10,74 мкМ НУК и 5,71 мкМ ИУК.

В результате культивирования на питательных средах с разными регуляторами роста ауксинового ряда у регенерантов черешни было установлено 2 типа корнеобразования. В первом случае корни развивались из каллусной ткани, которая формировалась из базальной части микропобега. Для второго типа характерно развитие корней непосредственно из тканей микропобега, его базальной части (рис. 1). Отмечено, что формирование корней второго типа происходит на безгормональной питательной среде, а также на среде, дополненной ИУК в концентрации 2,85–5,71 мкМ. На питательных средах с НУК и ИМК корневая система развивается из каллуса сферической формы бледно-желтого или белого цвета.

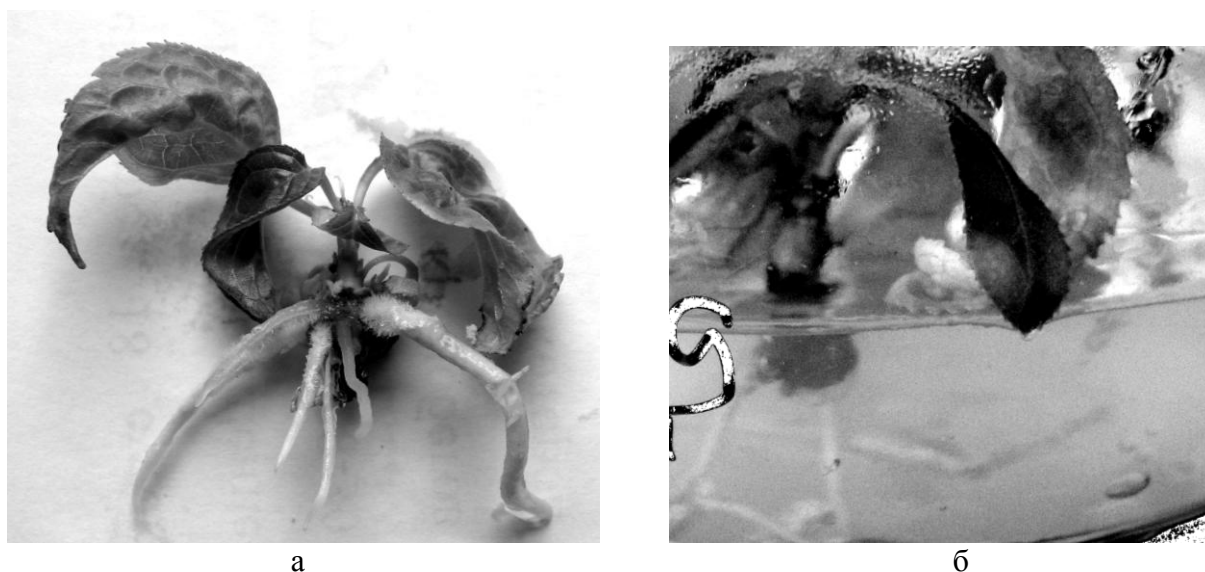


Рис. 1. Типы формирования корней у микропобегов черешни *in vitro*: а – развитие корней из каллусной ткани; б – развитие корней из базальной части

Изучение зависимости укоренения микропобегов *in vitro* от сроков культивирования (январь–февраль) на питательной среде показало, что в феврале (время выхода растений из состояния покоя) корневая система формируется у 70,6% исследуемых микропобегов. Развитие регенерантов в декабре было менее интенсивным и составляло 60%. Самый низкий процент укорененных растений получили при культивировании микропобегов в январе – 54,8% (рис. 2).

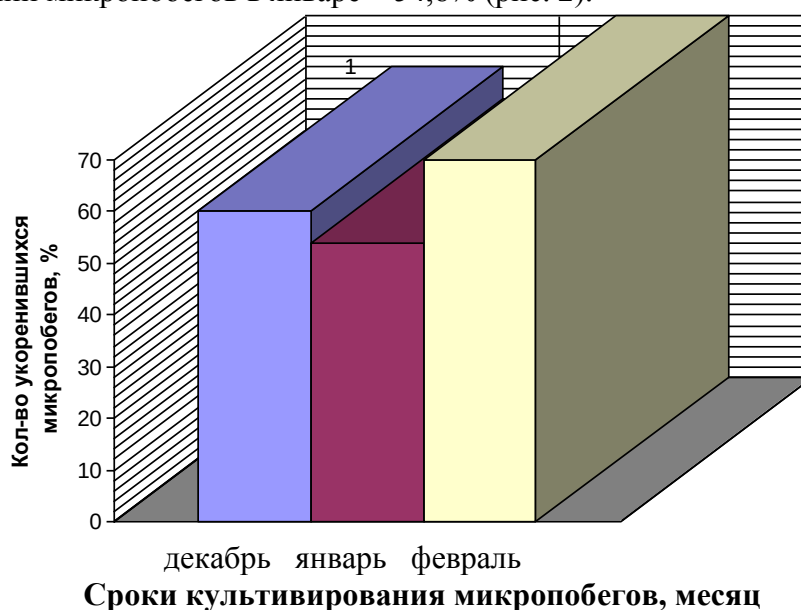


Рис. 2. Влияние сроков культивирования на ризогенез микропобегов черешни *in vitro*

Спустя 28–40 суток культивирования растения с нормально развитой корневой системой высаживали в стерильный субстрат (смесь торфа, перлита и дерновой земли в соотношении 1:1:1) для адаптации в условия *in vivo* (рис. 3).

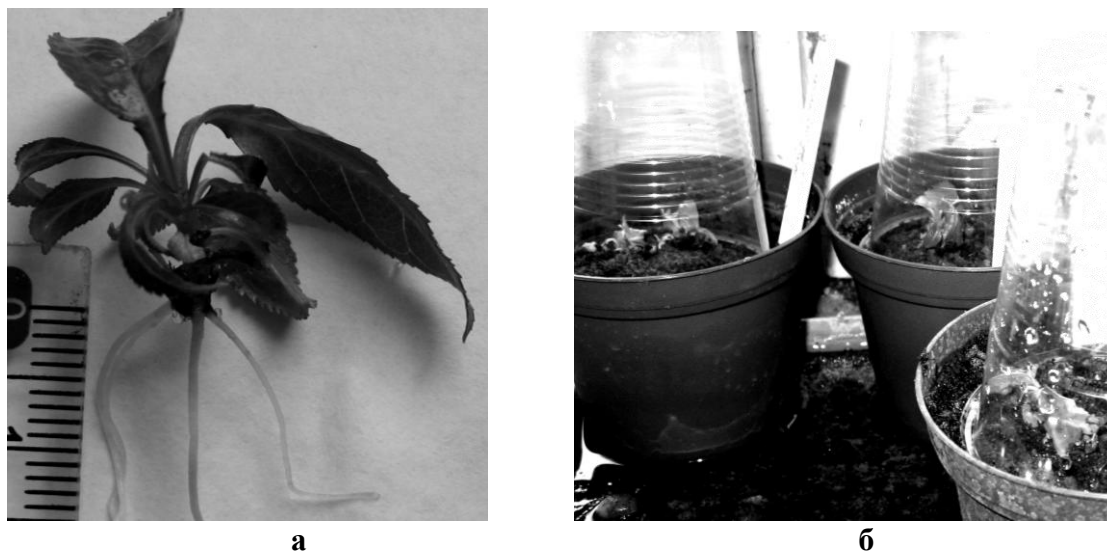


Рис. 3. Адаптация полученных в культуре *in vitro* регенерантов черешни к условиям теплицы: а – подготовленный к условиям *in vivo* регенерант; б – растения, высаженные в субстрат

Выводы

В результате экспериментальных исследований модифицированы питательные среды и определены эффективные регуляторы роста и их концентрации, индуцирующие ризогенез микропобегов черешни в условиях *in vitro*. Установлено, что оптимальной питательной средой для развития корней у микропобегов являются питательные среды Су (ИУК) и СуЗ, дополненные 2,85–5,7 мкМ ИУК и 5,37–10,7 мкМ НУК соответственно, а также питательная среда Су, не содержащая регуляторы роста. Выявлено 2 типа формирования корневой системы микропобегов черешни. Получены полноценные регенеранты черешни, адаптированные к условиям *in vivo*.

Список литературы

1. Бленда А.В. Мікроклональне розмноження *in vitro* представників підродини *Prunoidae* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2000. – Т. 32, №5. – С. 428–434.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур / Митрофанова О.В., Славгородская-Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. – Ялта: Крымпресс, 2000. – 45 с.
4. Здруйковская-Рихтер А.И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений. – Ялта: Крым – Фарм – Трейдинг, 2003. – 368 с.
5. 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., Лесникова-Седошенко Н.П., Лукичева Л.А., Смыков А.В., Сенин В.В., Литвинова Т.В. // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91. – С. 111–120.
6. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.

7. Кузнецова Н.В. Особенности введения первичных эксплантов четырех сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условия *in vitro* // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: Матер. III междунар. науч. конф. Минск, 14–16 мая 2008 г. – Минск, 2008. – С. 265–268.
8. Кузнецова Н.В., Митрофанова О.В. Влияние регуляторов роста на регенерационную способность четырех сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условиях *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць. – К: Логос, 2008. – Т. 5. – С. 287–290.
9. Кузнецова Н.В., Митрофанова О.В. Влияние регуляторов роста на повышение эффективности клонального микроразмножения (*Prunus avium* L.) // Біологія: від молекули до біосфери: Матер. III міжнар. наук. конф. молод. науковців. Харків, 18–21 листоп. 2008 р. – Харків, 2008. – С. 248.
10. Кузнецова Н.В. Влияние регуляторов роста на эффективность регенерации растений при клональном микроразмножении черешни (*Prunus avium* L.) // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2008. – Вып. 97. – С. 52–55.
11. Лесникова Н.П., Сусский А.Н., Горина В.М. Микроразмножение *in vitro* алычи (*Prunus serasifera* Ehrh.) как возможность ускорения селекционного процесса // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2002. – Вып. 86. – С. 57–60.
12. Лукичева Л.А., Митрофанова О.В. Клональное микроразмножение перспективных сортов вишни и сливы // Проблемы дендрологии, садоводства и цветоводства: Тез. докл. междунар. конф. молод. учен. 25–27 сент. 1995 г., Крым, Ялта. – Ялта, 1995. – С. 102.
13. Радилова Л.Д., Барабаш Т.Н. Микроразмножение вишни методом верхушечных меристем // Современные проблемы плодоводства: Тез. Докл. междунар. науч. конф., посв. 70-летию Белорус. Науч.-исслед. ин-та плод-ва, 9–13 октября 1995. – Самохваловичи, 1995. – С. 160–161.
14. Фомина Е.Г., Жук Н.Г. Клональное микроразмножение районированных в Беларуси сортов *Cerasus* // Плодоводство. – 1994. – Т. 9. – С. 64–74.
15. 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.
16. Kuznetsova N.V., Mitrofanova O.V. Investigation of regeneration ability of four cultivars of sweet cherry (*Prunus avium* L.) in conditions *in vitro* // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: Матер. IX междунар. конф. Звенигород, 8–12 сентября 2008 г. – Звенигород, 2008. – С. 60.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, №3. – P. 473–497.
18. Sauer Annemarie. *In vitro* – Vermehrung verschiedener genotypen von *Prunus avium* L. // Gartenbauwissenschaft. – 1983. – Bd. 48. – S. 124–127.
19. Snir Iona. *In vitro* micropropagation of sweet cherry cultivars // HortScience. – 1982. – Vol. 17, №2. – P. 735–736.

Рекомендовано к печати д.б.н. Митрофановой И.В.