

КЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO* МАЛИНЫ ДУШИСТОЙ

Н.В. Соловых, канд. биол. наук  
Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина  
(Россия, г. Мичуринск)

DOI:10.24412/2500-1000-2023-8-2-22-26

**Аннотация.** Оптимизированы минеральный, углеводный и гормональный составы питательных сред для размножения *in vitro* малины душистой. Установлено, что использование питательных сред по прописям QL и Андерсона позволяет получить более высокие коэффициенты размножения, чем применение традиционной для растений рода *Rubus* среды MS. Наилучший результат (коэффициент размножения 1,76, средняя длина побегов 18 мм) зарегистрирован на среде MS с половинными концентрациями азота, фосфора, калия и магния. Применение тидиазурона (ТДЗ) в концентрациях 0,1-0,2 мг/л в процессе размножения малины душистой *in vitro* позволило получить коэффициенты мультипликации на 37-67,7% больше, чем при использовании 6-БАП. ТДЗ вызывает незначительное уменьшение средней длины образующихся побегов. Поэтому на этапе мультипликации, предшествующем укоренению, его следует заменять на 6-БАП. В качестве источника углеводного питания наиболее эффективно использование сахарозы или глюкозы в концентрациях, равных 20 г/л.

**Ключевые слова:** малина душистая, *in vitro*, клональное размножение, питательные среды, цитокинины, сахара.

Клонирование растений *in vitro* в последние десятилетия широко используется в селекционной работе для быстрой мультипликации ценных генотипов и в производственной практике для получения оздоровленного высококачественного посадочного материала. Список видов, для которых разработаны технологии клонального микроразмножения, постоянно пополняется [1-3 и др.]. Это в полной мере относится к таким видам рода *Rubus*, как красная малина, ежевика, малино-ежевичные гибриды [4, 5 и др.]. Для душистой малины (*Rubus odoratus* L.) исследования по размножению *in vitro* единичны. Удалось осуществить клонирование этого вида в искусственной культуре, используя среду с минеральным составом по прописи MS [6], содержащую 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л гибберелловой кислоты (ГК), 0,1 мг/л β-индолил-3-масляной кислоты (ИМК) и 1 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП). Но коэффициент размножения *in vitro* по сравнению с другими видами рода *Rubus* остаётся низким [5].

В то же время, культура обладает большой ценностью. Крупные светло-зелёные листья душистой малины в сочетании с

крупными розовыми цветками и продолжительное цветение позволяют использовать её в качестве декоративного растения. Селекционеры рекомендуют активнее включать этот вид в селекционный процесс, так как он, помимо хороших декоративных качеств, обладает прямыми побегими, не требующими подвязки на шпалеры. Душистая малина является также донором устойчивости к пурпуровой пятнистости, вызываемой сумчатым грибом *Didymella applanata* Sacc [7], обладает высокой морозостойкостью.

Клональное размножение растений включает несколько этапов, а именно: введение эксплантов в стерильную культуру, мультипликация микрочеренков на искусственных питательных средах, укоренение растений *in vitro*, и адаптация их *in vivo*. Каждый из перечисленных этапов требует оптимизации методик применительно к виду.

Целью настоящего исследования являлся подбор минерального, углеводного и гормонального состава питательных сред для этапа мультипликации душистой малины *in vitro*.

**Материалы и методы исследований**

В стерильную культуру вводили освобождённые от кроющих чешуй латеральные почки с одревесневших побегов малины душистой, взятые в первой декаде сентября. Введение осуществляли по стандартной методике [8]. Стерилизацию проводили 0,1%-м раствором сулемы (хлорида ртути) в течение 60-90 секунд с последующей промывкой проавтоклавированной дистиллированной водой. Экспланты на этапе введения в культуру *in vitro* культивировали на среде с минеральным составом по прописи MS, содержащей 0,2 м/л 6-БАП и 0,5 мг/л ГК.

Для оптимизации минерального состава питательных сред на этапе мультипликации микрочеренки малины душистой высаживали на среды по прописям MS, Андерсона [9] QL [10] в модификации A. Standardi и F. Catalano [11]. Использовали также среду MS с уменьшенным вдвое содержанием солей макроэлементов (1/2MS). При подборе оптимального минерального состава в среды вносили 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК и 1 мг/л 6-БАП.

Для снятия апикального доминирования в качестве вещества с цитокининовой активностью использовали производное дифенилмочевины тидиазурон (ТДЗ) в концентрациях 0,1, 0,2 и 0,3 мг/л. Контролем служил 6-БАП (синтетический цитокинин из группы аденина) в концентрации 1 мг/л. Пригодность 6-БАП для размножения малины душистой была продемонстрирована ранее [5].

Для оптимизации углеводного питания в среды включали дисахарид сахарозу или моносахарид глюкозу в концентрациях 10, 20 или 30 г/л. Выбор сахаров и их концентраций определён предварительно полученными данными по размножению других видов рода *Rubus* в присутствии различных углеводов [3-5].

Культуральные сосуды как на этапе введения в культуру, так и на этапе мультипликации содержали в условиях интенсивного освещения 2500 Лк. Световой

день составил 16 часов, температура  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Через 30 суток после высадки были проведены учёты коэффициентов размножения и длины вновь образовавшихся побегов. В каждом варианте опыта использовали шесть биологических повторностей по 10 эксплантов в каждой. Математическая обработка экспериментальных данных проведена с помощью статистического пакета программы Microsoft Excel.

### Результаты исследований и их обсуждение

Сравнение коэффициентов размножения и средней длины образовавшихся побегов на разных питательных средах показало относительно более высокую эффективность использования среды QL, которая отличается от традиционной для растений рода *Rubus* среды MS более низким содержанием нитрата аммония (в четыре раза). Аналогичный результат был получен при использовании среды MS с уменьшенным вдвое содержанием солей макроэлементов (т.е. была уменьшена не только концентрация аммонийного и нитратного азота, но и концентрации дигидрофосфата калия и сульфата магния). Коэффициенты размножения на средах QL и 1/2MS оказались соответственно на 56% и 69,3% выше, а средняя длина образовавшихся побегов на 114,8% и 116% выше, чем названные морфометрические показатели на полной среде MS. Во всех перечисленных вариантах различия с контролем (полной средой MS) статистически существенны ( $P < 0,05$ ).

На среде Андерсона, содержащей вчетверо меньше нитрата аммония и нитрата калия, но примерно равное количество фосфатов по сравнению со средой MS, также наблюдается тенденция к увеличению коэффициента размножения и средней длины образовавшихся побегов (рис. 1, 2). Однако статистически различия по названным показателям с контрольным вариантом (полная среда MS) не являются существенными.

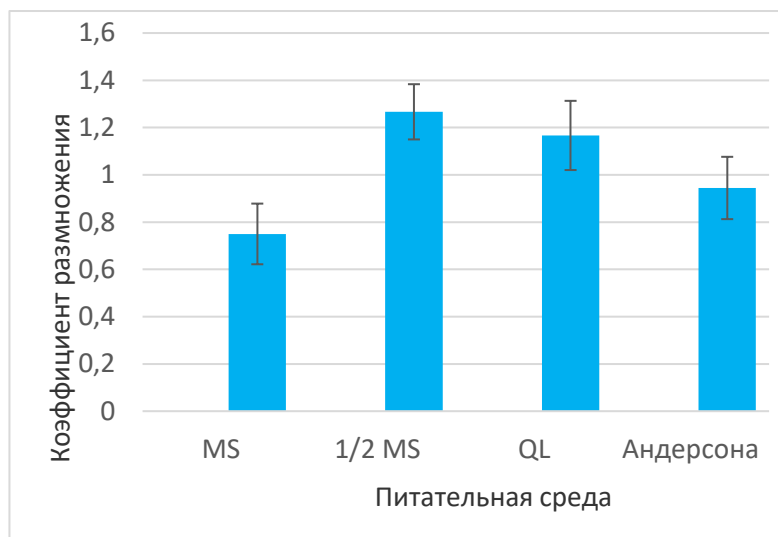


Рис. 1. Коэффициенты размножения малины душистой на средах с различным минеральным составом (30 суток культивирования)

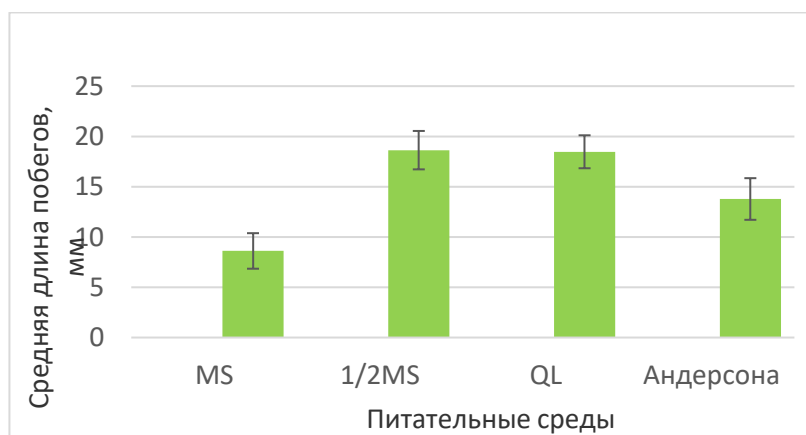


Рис. 2. Средняя длина побегов малины душистой на средах с различным минеральным составом (30 суток культивирования)

Была продемонстрирована достаточно высокая эффективность применения тидиазурана в качестве вещества с цитокининовой активностью. Концентрации ТДЗ равные 0,1-0,2 мг/л оказались оптимальными и позволили получить коэффициенты размножения от  $1,74 \pm 0,14$  до  $2,13 \pm 0,11$ , что на 37-67,7% больше, чем при использовании 6-БАП. Однако тидиазурон приводил к незначительному (в среднем на 18,3%) уменьшению длины образовавшихся побегов. Хотя это уменьшение не является статистически значимым, ТДЗ не может быть рекомендован для последнего этапа мультипликации, предшествующего укоренению.

Сравнение эффективности применения сахарозы и глюкозы в качестве источников углеводного питания малины душистой не позволило выявить существенных различий между названными сахарами, хотя и наблюдалась тенденция к увеличению коэффициента размножения на средах с глюкозой. Удалось доказать, что концентрация углеводов 30 г/л, обычно применяемая для растений рода *Rubus*, не является оптимальной для душистой малины. Для размножения растений этого вида *in vitro* более эффективно вносить в питательные среды сахарозу или глюкозу в концентрациях 20 г/л (рис. 3).

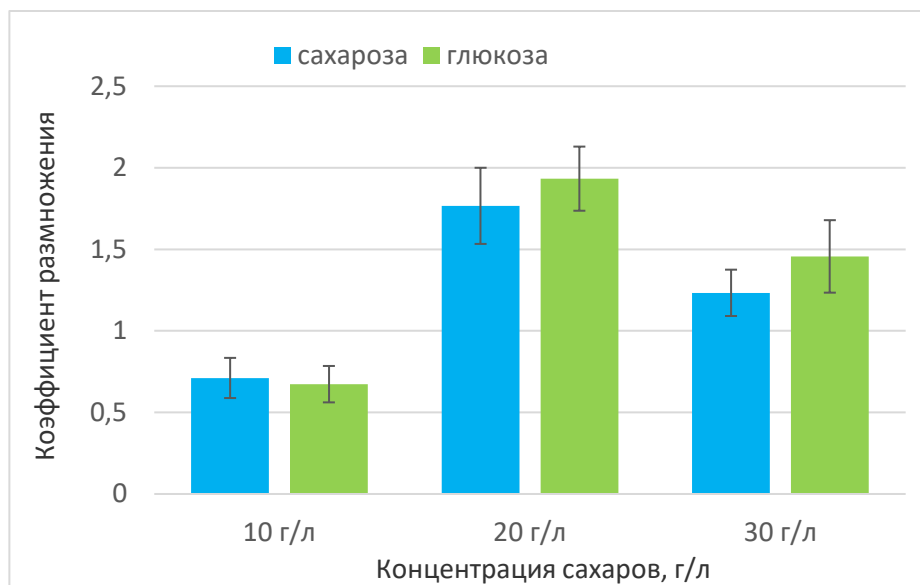


Рис. 3. Коэффициенты размножения малины душистой на среде MS с различным содержанием сахаров в присутствии 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК и 1 мг/л 6-БАП (30 суток культивирования).

Используя полученные в описанных экспериментах данные об оптимальном минеральном, углеводном и гормональном составе сред, удалось увеличить коэффициент размножения душистой малины до  $4,27 \pm 0,43$ . Для этого использовали среду по прописи MS с уменьшенной вдвое концентрацией солей макроэлементов, содержащую 0,1 мг/л ИМК, 0,5 мг/л ГК, 0,2 мг/л ТДЗ и 20 г/л глюкозы.

#### Заключение

Для размножения *in vitro* малины душистой оптимальными являются питательные среды с более низким содержанием аммонийного и нитратного азота по сравнению с традиционно применяемой для растений рода *Rubus* средой по прописи MS. Снижение в среде MS концентрации солей макроэлементов вдвое или замена её на среду QL в модификации A. Standardi и

F. Catalano позволяют увеличить коэффициент размножения малины душистой на 56-69%.

Применение тидиазурона в концентрациях 0,1-0,2 мг/л для снятия апикального доминирования при мультипликации малины душистой позволило получить коэффициенты размножения от  $1,74 \pm 0,14$  до  $2,13 \pm 0,1$ , что на 37-67,7% выше, чем при использовании 6-БАП. ТДЗ вызывает незначительное уменьшение средней дины образующихся побегов, поэтому на этапе мультипликации, предшествующем укоренению, его следует заменять на 6-БАП.

При размножении *in vitro* малины душистой в качестве источника углеводного питания наиболее эффективно использование дисахарида сахарозы или моносахарида глюкозы концентрациях, равных 20 г/л.

#### Библиографический список

1. Деменко В.И. Микрклональное размножение садовых растений: Учебное пособие. – М.: РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, 2007. – 55 с.
2. Муратова С.А. Размножение садовых культур *in vitro* /С.А. Муратова, Д.Г. Шорников, М.Б. Янковская. – Мичуринск-научоград РФ, ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина, ОАО Тамбовская типография «Пролетарский светоч». 2008. – 68 с.
3. Муратова С.А. Влияние различных углеводов на регенерацию, размножение и рост растений *in vitro* / С.А. Муратова, Р.В. Папихин, М.Б. Янковская // Плодоводство и ягодоводство России. – 2008. – Т. XXXI. – Вып. 2. – С. 86-94.
4. Джигадло Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / Е.Н. Джигадло, М.И. Джигадло, Л.В. Голышкина. – Орёл: ГНУ ВНИИСПК. 2005. – 51 с.

5. Соловых Н.В. Размножение *in vitro* растений рода *Rubus* / Н.В. Соловых, С.А. Муратова // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2011. – №1 (217). – С. 32-39.

6. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15, №13. – P. 473-497.

7. Чеснокова И.Н. Биология возбудителя пурпуровой пятнистости малины и наследование устойчивости к болезни. Диссертация ...кандидата биол. наук. 03.00.05 Мичуринск. 1982. – 134 с.

8. Индукция морфогенеза и тканевая селекция плодовых и ягодных культур: метод. рекомендации / сост. В.М. Тюленев, Л.В. Осипова, И.Г. Тихонова, С.Л. Расторгуев, Р.П. Евсеева. Мичуринск: ВНИИ Генетики и селекции плодовых растений, 1996. – 75 с.

9. Anderson W.C. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis* / W.C. Anderson // *Acta Horticulturae.* – 1980. – №112. – P. 13-20.

10. Quoirin M. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. / M. Quoirin, P. Lepoivre // *Acta Hortic.* – 1977. – V. 78. – P. 437-442.

11. Standardi A. Tissue culture propagation of kiwifruit / A. Standardi, F. Catalano // *Comb. Proc. Intern. Plant propagators' soc.* – 1984. – Vol. 34. – P. 236-243.

## CLONAL REPRODUCTION IN VITRO OF FLOWERING RASPBERRY

**N.V. Solovykh**, *Candidate of Biological Sciences*

**I.V. Michurin Federal Scientific Centre**

**(Russia, Michurinsk)**

**Abstract.** *The mineral, carbohydrate and hormonal compositions of nutrient media for in vitro reproduction of flowering raspberry have been optimized. It was found that the use of nutrient media according to the prescriptions of QL and Anderson allows to obtain higher reproduction coefficients than the use of the MS medium, traditional for plants of the genus Rubus. The best result (reproduction coefficient 1.76, average shoot length 18 mm) was recorded on MS medium with half concentrations of nitrogen, phosphorus, potassium and magnesium. The use of thidiazuron (TDZ) in concentrations of 0.1-0.2 mg/l in the process of reproduction of flowering raspberry in vitro allowed to obtain multiplication coefficients by 37-67.7% more than when using 6-BAP. TDZ causes a slight decrease in the average length of the shoots formed. Therefore, at the multiplication stage preceding rooting, it should be replaced with 6-BAP. As a source of carbohydrate nutrition, the most effective use of sucrose or glucose in concentrations equal to 20 g/l.*

**Keywords:** *sweet raspberries, in vitro, clonal reproduction, nutrient media, cytokinins, sugars.*