

УДК 634.73:581.143.6:581.432

РИЗОГЕНЕЗ И АДАПТАЦИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ ГОЛУБИКИ

Божидай Татьяна Николаевна
мл. научный сотрудник
отдела биотехнологии

*Республиканское научно-
производственное дочернее
унитарное предприятие
"Институт плодоводства"
Самохваловичи, Беларусь*

Адаптация растений к нестерильным условиям является последним этапом размножения *in vitro* и должна проходить постепенно, чтобы избежать гибели растений вследствие резкого изменения относительной влажности, освещенности, температуры. Укоренение *ex vitro* позволяет упростить этот этап и одновременно получить растения, адаптированные к естественным условиям. Цель данных исследований – определить оптимальные условия для ризогенеза и адаптации микропобегов голубики. Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» (Беларусь). Материалом для исследования служили растения-регенеранты голубики (*V. Angustifolium* Ait. × *V. Corymbosum* L.) сорта Northblue. В результате проведенных исследований было установлено, что в условиях *in vitro* доля укорененных растений-регенерантов голубики сорта Northblue после четырех недель культивирования составила 0-36,7 %, после восьми – количество укоренившихся регенерантов возросло до 63,3 %. При этом негативным явлением в процессе укоренения *in vitro* голубики на средах с ИМК и ИУК являлась высокая частота (100 %) каллусообразования. На среде без ауксина после 4 недель каллус отсутствовал, после 8 – частота каллусообразования составила 36,7 %. После восьми недель культивирования

UDC 634.73:581.143.6:581.432

RHIZOGENESIS AND ADAPTATION OF BLUEBERRY REGENERANTS

Bozhiday Tatiana
Junior Research Associate
of Department of Biotechnology

*Republican
Scientific production
subsidiary unitary enterprise
"Institute of fruit growing"
Samokhvalovich, Belarus*

Adaptation of plants to non-sterile conditions is the last stage of reproduction *in vitro* and should be gradual in order to avoid the ruin of plants due to a sudden change in relative humidity, light and temperature. Rooting *ex vitro* allows to simplify this stage and simultaneously to obtain the plants adapted to natural conditions. The purpose of these study is to determine the optimal conditions for rhizogenesis and adaptation of blueberry micro shoots. Research was carried out in the Department of Biotechnology of the Republican Unitary Enterprise "Fruit Growing Institute" (Belarus). The material for the study was the regenerating plants of Northblue blueberry (*V. angustifolium* Ait. × *V. corymbosum* L.). As a result of carried out study, it was found that *in vitro* conditions the proportion of rooted regenerating plants of Northblue blueberry after four weeks of cultivation was 0-36.7 %, after eight week – the number of rooted regenerants increased to 63.3%. At the same time, a high frequency (100%) of callus formation was a negative phenomenon of blue berry rooting *in vitro* on media with IBA and IAA. On medium without auxin after 4 weeks, callus was absent, after 8 weeks – the frequency of callus formation was 36.7 %. After eight weeks of cultivation, the highest increasing of shoot's growth regenerating Northblue

наибольший прирост растения-регенеранты сорта Northblue имели на питательной среде с 0,3 мг/л ИМК. По длине корней лучший результат был получен на питательной среде с 1 мг/л ИУК. Исследования показали, что тип субстрата влияет на прирост ($p < 0,05$) и длину корней ($p < 0,001$) растений-регенерантов голубики. По длине побега и корней растения на мхе со слоем торфа имели самые высокие показатели и достоверно отличались от растений на других субстратах.

Ключевые слова: ГОЛУБИКА, КУЛЬТУРА *IN VITRO*, РИЗОГЕНЕЗ, АДАПТАЦИЯ, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ

plants was on a nutrient medium with 0.3 mg / l IBA. The best length of the roots was obtained on nutrient medium with 1 mg / l IAA. Study have shown that the type of substrate affects growth ($p < 0.05$) and root length ($p < 0.001$) of blueberry regenerating plants. According to the length of the shoot and roots, the plants on the moss with peat layer had the highest indices and were significantly different from the plants on other substrates.

Key words: BLUEBERRY, *IN VITRO* CULTURE, RHIZOGENESIS, ADAPTATION, MORPHOLOGICAL PARAMETERS

Введение. Одним из этапов микроразмножения является укоренение регенерантов и их адаптация к нестерильным условиям. Укоренение регенерантов *Vaccinium* spp. может проходить *in vitro* [1-6] и *ex vitro* [4, 7, 8].

Для эффективного укоренения в условиях *in vitro* большое значение имеет правильный выбор вида ауксина и его концентрации, *ex vitro* – субстрата, а при необходимости предварительной обработки ауксином – его вида и концентрации.

О.А. Кудряшовой с соавторами наиболее высокий выход укорененных (94,4-96,4 %) жизнеспособных (73,3-94,5 %) регенерантов голубики отмечен на питательных средах (1/2 WPM), содержащих одновременно индолилмасляную кислоту (ИМК) и индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрациях по 0,2 мг/л (для сорта Patriot) и по 0,5 мг/л (для сорта Northland) [2].

Исходя из исследований некоторых авторов, оптимальной средой для индукции ризогенеза голубики в условиях *in vitro* является 1/2 WPM, содержащая 20 г/л сахарозы, 2 мг/л ИУК (укоренение 93,0 %) или 1 мг/л ИМК (укоренение 97,0 %) [9, 10].

Адаптация растений к нестерильным условиям является последним этапом размножения *in vitro* и должна проходить постепенно, чтобы избе-

жать гибели растений вследствие резкого изменения относительной влажности, освещенности, температуры. Некоторые авторы рекомендуют высаживать укорененные *in vitro* растения в верховой торф [3], другие – в субстрат, состоящий из смеси верхового торфа, песка и перлита [4], содержать их в контролируемых условиях и постепенно снижать влажность в течение 2-3 недель [3, 4]. Укоренение *ex vitro* позволяет упростить этот этап и одновременно получить растения, адаптированные к естественным условиям. Так, 80-100 % укорененных растений-регенерантов голубики было получено на мхе *Sphagnum* L. [7], смеси торфа и вермикулита в соотношении 2:1 с предварительной обработкой побегов ИМК [8], смеси торфа и перлита (в соотношении 3:2 и 1:1) с предварительной обработкой побегов ИМК [11, 12].

Цель данных исследований – определить оптимальные условия для ризогенеза и адаптации микропобегов голубики.

Объекты и методы исследований. Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородия» (Беларусь).

Материалом для исследования служили растения-регенеранты голубики полувысокой (*V. Angustifolium* Ait. × *V. Corymbosum* L.) сорта Northblue. При укоренении *in vitro* регенеранты культивировали на агаризованной питательной среде WPM [13] с 1/2 макро- и микросолей, 1/2 хелата железа с добавлением витаминов (В1, В6, РР), глицина, сахарозы (20 г/л), ИУК и ИМК в концентрациях 0,3 мг/л; 0,5 мг/л; 0,8 мг/л; 1,0 мг/л и без гормонов. Стерилизацию сред проводили при давлении 0,9 атм. в течение 15 мин после введения в них всех необходимых витаминов и физиологически активных веществ. Условия культивирования растений-регенерантов: освещение 2,5-3,0 тыс. лк, температура +21...+23 °С, фотопериод 16/8 ч. Длительность субкультивирования – 4-8 недель.

Адаптация *ex vitro*. Растения, укорененные *in vitro*, высаживали в кассеты, заполненные одним из трех видов субстратов (верховой торф, мох

Sphagnum L., перлит). Кассеты накрывали полиэтиленовой пленкой, создавая условия повышенной влажности, до тех пор, пока не появлялись молодые листья. Полив производился дистиллированной водой. Длительность этапа адаптации – 4 недели.

Укоренение *ex vitro*. Для укоренения микропобегов в условиях *ex vitro* использовали следующие виды субстратов: мох *Sphagnum* L. со слоем верхового торфа (0,5 см); верховой торф со слоем перлита (0,5 см); верховой торф; мох *Sphagnum* L. со слоем перлита (0,5 см); перлит. Микропобеги укореняли в мини-парниках 450×200×70 мм (расстояние между рядами 10-15 мм, в ряду – 7-10 мм). Условия укоренения: освещение 2,5-3,0 тыс. лк, температура +20...+22 °С, фотопериод 16/8 ч. Длительность культивирования – 4 недели.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0, используя ANOVA, критерий Дункана ($p < 0,05$) для сравнения средних значений ($n=3$). В табл. 1-3 данные отображены в виде: среднее значение ± средняя статистическая ошибка. Одинаковое буквенное значение в столбцах означает недостоверность различий между средними значениями. Построение графика проводили в программе Microsoft Excel.

Обсуждение результатов. В результате проведенных исследований было установлено, что в условиях *in vitro* доля укорененных растений-регенерантов голубики сорта Northblue после четырех недель культивирования составила 0-36,7 %, после восьми – количество укоренившихся регенерантов возросло до 63,3 % (рис.). При этом негативным явлением в процессе укоренения *in vitro* голубики на средах с ИМК и ИУК являлась высокая частота (100 %) каллусообразования. На среде без ауксина после 4 недель каллус отсутствовал, после 8 – частота каллусообразования составила 36,7 %. Рассматривая морфологическую сторону ризогенеза *in vitro*, отмечено, что прирост побегов сортов голубики после четырех недель культи-

вирования отсутствовал, после восьми – не зависел ($p>0,05$) от гормонального состава среды. Длина корней зависела ($p<0,05$) как от длительности культивирования и гормонального состава среды, так и от совместного действия двух факторов.

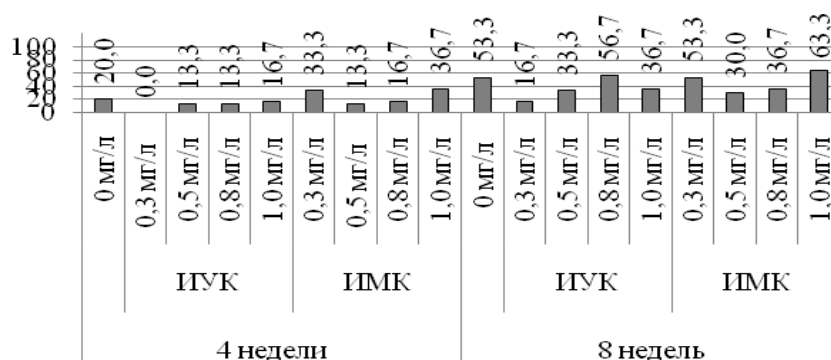


Рис. Зависимость доли укоренившихся регенерантов голубики сорта Northblue от гормонального состава среды и длительности культивирования

После восьми недель культивирования наибольший прирост растения-регенеранты сорта Northblue имели на питательной среде с 0,3 мг/л ИМК. По длине корней лучший результат был получен на питательной среде с 1 мг/л ИУК, однако статистически значимо не отличался от результатов, полученных на среде с 0,5 и 0,8 мг/л ИУК, 0,3 и 1,0 мг/л ИМК (табл. 1).

Таблица 1 – Морфометрические показатели развития регенерантов голубики сорта Northblue при укоренении *in vitro*

Гормональный состав среды	Длина побега, см	Прирост побега, см	Длина корней, см	
			максимальная	основной массы
Без гормонов	2,83±0,08 ^a	0,47±0,18 ^a	0,89±0,06 ^{ab}	0,65±0,13 ^a
0,3 мг/л ИУК	2,80±0,66 ^a	0,73±0,53 ^{ab}	0,53±0,03 ^a	0,50±0,00 ^a
0,5 мг/л ИУК	2,90±0,62 ^a	1,04±0,37 ^{ab}	1,32±0,21 ^{bcd}	1,04±0,24 ^{bc}
0,8 мг/л ИУК	3,43±0,40 ^{ab}	1,07±0,41 ^{ab}	1,71±0,04 ^{cd}	1,38±0,09 ^c
1,0 мг/л ИУК	3,58±0,23 ^{ab}	1,24±0,18 ^{ab}	1,88±0,13 ^d	1,41±0,10 ^c
0,3 мг/л ИМК	4,49±0,37 ^b	1,83±0,28 ^b	1,47±0,13 ^{bd}	1,16±0,08 ^{bc}
0,5 мг/л ИМК	3,01±0,26 ^a	0,88±0,28 ^{ab}	1,07±0,08 ^{abc}	0,83±0,07 ^{ab}
0,8 мг/л ИМК	2,84±0,40 ^a	0,79±0,31 ^{ab}	1,48±0,61 ^{bcd}	0,77±0,11 ^{ab}
1,0 мг/л ИМК	3,40±0,45 ^{ab}	1,24±0,28 ^{ab}	1,32±0,19 ^{bcd}	1,06±0,13 ^{bc}

Доля адаптированных к условиям *ex vitro* растений голубики после четырех недель культивирования составила 100 %.

Установлено достоверное влияние ($p < 0,01$) адаптационного субстрата на длину корней ($p < 0,05$) растений голубики сорта Northblue и показано, что оптимальными субстратами для развития побегов голубики являются верховой торф и мох *Sphagnum* L. Регенеранты голубики, адаптированные на данных субстратах, имели наибольший прирост побега. Перлит стимулировал более интенсивное развитие корневой системы (табл. 2).

Укоренение голубики непосредственно в субстрате (минуя стадию ризогенеза в культуре *in vitro*) позволило получить до 100 % укорененных растений-регенерантов (табл. 3).

Таблица 2 – Морфометрические показатели развития растений голубики после четырех недель адаптации на различных субстратах

Адаптационный субстрат	Длина побега, см	Прирост побега, см	Длина корней, см	
			<u>Δ</u> максимальная максимальная	<u>Δ</u> основной массы основной массы
Верховой торф	7,90±1,26 ^a	4,15±0,74 ^a	$\frac{2,08 \pm 0,28^{ab}}{3,31 \pm 0,34^a}$	$\frac{1,39 \pm 0,10^b}{2,36 \pm 0,13^a}$
Мох <i>Sphagnum</i> L.	6,32±1,09 ^a	3,21±0,75 ^a	$\frac{1,47 \pm 0,15^a}{2,86 \pm 0,15^a}$	$\frac{0,77 \pm 0,06^a}{1,88 \pm 0,12^a}$
Перлит	5,65±0,27 ^a	2,08±0,15 ^a	$\frac{2,33 \pm 0,12^b}{4,21 \pm 0,22^b}$	$\frac{1,07 \pm 0,19^{ab}}{2,37 \pm 0,19^a}$

Таблица 3 – Морфометрические показатели развития растений-регенерантов голубики при укоренении *ex vitro*

Субстрат	Доля укоренившихся регенерантов, %	Длина побега, см	Прирост побега, см	Длина корней, см	
				максимальная	основной массы
Мох <i>Sphagnum</i> L. со слоем верхового торфа	100,0	3,86±0,21 ^c	2,05±0,09 ^c	2,68±0,13 ^c	1,49±0,08 ^c
Верховой торф со слоем перлита	100,0	2,71±0,17 ^b	0,81±0,17 ^{ab}	0,79±0,11 ^a	0,54±0,08 ^a
Верховой торф	96,3	3,45±0,13 ^c	1,41±0,25 ^{bc}	1,56±0,17 ^b	0,88±0,09 ^b
Мох <i>Sphagnum</i> L. со слоем перлита	61,5	1,72±0,28 ^a	0,31±0,31 ^a	0,70±0,07 ^a	0,45±0,04 ^a
Перлит	91,7	1,87±0,19 ^a	0,33±0,25 ^a	0,78±0,02 ^a	0,51±0,02 ^a

Исследования показали, что тип субстрата влияет на прирост ($p < 0,05$) и длину корней ($p < 0,001$) растений-регенерантов голубики. По

длине побега и корней растения на мхе со слоем торфа имели самые высокие показатели и достоверно отличались от растений на других субстратах.

Выводы. Проведенные исследования показали, что лучшим вариантом укоренения *in vitro* по комплексу показателей явилось культивирование растений-регенерантов голубики сорта Northblue на питательной среде с ИМК в концентрации 0,3 мг/л, *ex vitro* – на мхе *Sphagnum* L. со слоем верхового торфа (0,5 см). Длительность этапа ризогенеза голубики *in vitro* составляет восемь недель, *ex vitro* – четыре. Для адаптации укорененных *in vitro* растений может быть использован в качестве субстрата верховой торф или мох *Sphagnum* L. Укоренение в условиях *ex vitro* сопровождалось адаптацией растений-регенерантов и позволяло ускорить процесс микроразмножения растений голубики.

Литература

1. Решетников, В.Н. Некоторые аспекты микрклонального размножения голубики высокой и брусники обыкновенной / В.Н. Решетников, Т.В. Антипова, В.Л. Филиппеня // Плодоводство: научные труды. – Самохваловичи, 2007. – Т. 19. – С. 209-215.
2. Эффекты экзогенных ауксинов на изменение количественных показателей регенерантов *Vaccinium corymbosum* *in vitro* / О.А. Кудряшова, А.А. Волотович, Т.В. Герасимович [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2013. – № 3. – С. 28-35.
3. Ostrolucka, M.G. *In vitro* propagation of several *Vaccinium corymbosum* L. and *Vaccinium vitis-idaea* L. cultivars / M.G. Ostrolucka, A. Gajdošová, E. Ondrušková [et al.] // Agronomijas Vestis. – 2009. – N 12. – P. 75-80.
4. Meiners, J. Efficient *in vitro* regeneration for *Vaccinium* species / J. Meiners, M. Schwab, I. Szankowsk // Plant Cell Tiss Organ Cult, Springe. – 2007. – Vol. 89. – P. 169-176.
5. Емельянова, Е.П. Влияние ауксинов на укоренение *in vitro* сортов *Vaccinium uliginosum* L. / Е.П. Емельянова // Известия Алтайского государственного университета. Серия биол. наук. – 2010. – № 3. – С. 25-28.
6. Кудряшова, О.А. Изменчивость количественных признаков у регенерантов *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro* на средах разного гормонального состава / О.А. Кудряшова, Л.С. Цвирко, А.А. Волотович // Веснік Палескага дзяржа унагауніверсітэта. – 2011. – № 2. – С. 13-17.
7. Liu, C. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern high bush blueberry cultivars / C. Liu, Pete Callow, Lisa J. Rowland [et al.] // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2010. – Vol. 103, N 1. – P. 137–144.
8. Mihaljevic, S. Alanine conjugate of indole-3-butyric acid improves rooting of high-bush blueberries / S. Mihaljevic, B. Salopek-Sondi // Plant Soil Environ. – 2012. – Vol. 58, N 5. – P. 236–241.
9. Решетников, В.Н. Микрклональное размножение брусники обыкновенной / В.Н. Решетников [и др.] // Генетические основы селекции растений. Т. 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск: Беларус. навука, 2012. – Гл. 5. – С. 335-346.

10. Решетников, В.Н. Микроклональное размножение голубики высокорослой / В.Н. Решетников [и др.] // Генетические основы селекции растений. Т. 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева – Минск: Беларус. навука, 2012. – Гл. 5. – С. 348-354.
11. Debnath, S.C. A two-step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry / S.C. Debnath // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. – 2009. – Vol. 45. – P. 122–128.
12. Influences of media and cytokinins on shoot proliferation of 'Brightwell' and 'Choice' blueberries in vitro / Y. Jiang [et al.] // Acta Horticulturae. – 2009. – Vol. 810. – P. 581–586.
13. Lloyd, G. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture / G. Lloyd, B. Mc Cown // Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society. – 1980. – Vol. 30. – P. 421–427.

References

1. Reshetnikov, V.N. Nekotorye aspekty mikroklonal'nogo razmnzozhenija golubiki vysokoj i brusniki obyknovennoj / V.N. Reshetnikov, T.V. Antipova, V.L. Filipenja // Plodovodstvo: nauchnye trudy. – Samohvalovich, 2007. – T. 19. – S. 209-215.
2. Jeffekty jekzogenykh auksinov na izmenenie kolichestvennyh pokazatelej regenerantov *Vaccinium corymbosum* in vitro / O.A. Kudrjashova, A.A. Volotovich, T.V. Gerasimovich [i dr.] // Vesci Nacyjanal'naj akadzemii navuk Belarusi. Seryja bijalagichnyh navuk. – 2013. – № 3. – S. 28-35.
3. Ostrolucka, M.G. In vitro propagation of several *Vaccinium corymbosum* L. and *Vaccinium vitisidaea* L. cultivars / M.G. Ostrolucka, A. Gajdošová, E. Ondrušková [et al.] // Agronomijas Vestis. – 2009. – N 12. – P. 75-80.
4. Meiners, J. Efficient in vitro regeneration for *Vaccinium* species / J. Meiners, M. Schwab, I. Szankowsk // Plant Cell Tiss Organ Cult, Springe. – 2007. – Vol. 89. – P. 169-176.
5. Emel'janova, E.P. Vlijanie auksinov na ukorenenie in vitro sortov *Vaccinium uliginosum* L. / E.P. Emel'janova // Izvestija Altajskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija biol. nauk. – 2010. – № 3. – S. 25-28.
6. Kudrjashova, O.A. Izmenchivost' kolichestvennyh priznakov u regenerantov *Vaccinium corymbosum* L. invitro na sredah raznogo gormonal'nogo sostava / O.A. Kudrjashova, L.S. Cvirko, A.A. Volotovich // Vesnik Paleskaga dzjarzha unagauniversitjeta. – 2011. – № 2. – S. 13-17.
7. Liu, C. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern high bush blueberry cultivars / C. Liu, Pete Callow, Lisa J. Rowland [et al.] // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2010. – Vol. 103, N 1. – P. 137–144.
8. Mihaljevic, S. Alanine conjugate of indole-3-butyric acid improves rooting of highbush blueberries / S. Mihaljevic, B. Salopek-Sondi // Plant Soil Environ. – 2012. – Vol. 58, N 5. – P. 236–241.
9. Reshetnikov, V.N. Mikroklonal'noe razmnzozhenie brusniki obyknovennoj / V.N. Reshetnikov [i dr.] // Geneticheskie osnovy selekcii rastenij. T. 3. Biotehnologija v selekcii rastenij. Kletohnaja inzhenerija. nauch. red. A.V. Kil'chevskij, L.V. Hotyleva. – Minsk: Belarus. navuka, 2012. – Gl. 5. – S. 335-346.
10. Reshetnikov, V.N. Mikroklonal'noe razmnzozhenie golubiki vysokorosloj / V.N. Reshetnikov [i dr.] // Geneticheskie osnovy selekcii rastenij. T. 3. Biotehnologija v selekcii rastenij. Kletohnaja inzhenerija / nauch. red. A.V. Kil'chevskij, L.V. Hotyleva – Minsk: Belarus. navuka, 2012. – Gl. 5. – S. 348-354.
11. Debnath, S.C. A two-step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry / S.C. Debnath // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. – 2009. – Vol. 45. – P. 122–128.
12. Y. Jiang Influences of media and cytokinins on shoot proliferation of 'Brightwell' and 'Choice' blueberries in vitro / Y. Jiang [et al.] // Acta Horticulturae. – 2009. – Vol. 810. – P. 581–586.
13. Lloyd, G. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture / G. Lloyd, B. Mc Cown // Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society. – 1980. – Vol. 30. – P. 421–427.