

## БИОТЕХНОЛОГИЯ УСКОРЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЯГОДНЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

## BIOTECHNOLOGY OF ACCELERATED PRODUCTION OF REGENERANTS IN AGRICULTURAL BERRY PLANTS IN IN VITRO CULTURE

**В. Ф. Черник,**

*кандидат биологических наук, доцент кафедры морфологии и физиологии человека и животных факультета естествознания Белорусского государственного педагогического университета имени Максима Танка*

**V. Chernik,**

*PhD in Biology, Associate Professor, the Department of Morphology and Physiology of Human and Animals, Belarusian State Pedagogical University named after Maxim Tank*

Поступила в редакцию 03.10.22.

Received on 03.10.22.

Изучено влияние агаризованной питательной среды Мурасиге – Скуга различных модификаций и жидкой среды Андерсона на прорастание изолированных семян плодово-ягодных культур – голубики высокой и клюквы четырехлепестной. Наиболее выраженный стимулирующий эффект у голубики высокой наблюдался на агаризованной среде Мурасиге – Скуга с добавлением гиббереллина (1,5 мг/л). Оптимальной для морфогенеза регенерантов клюквы четырехлепестной оказалась агаризованная питательная среда Мурасиге – Скуга с добавлением 2,0 мг/л гиббереллина, о чем свидетельствуют морфометрические показатели проростков. Установлено, что при культивировании семян голубики высокой сортов Блюрей и Дикси и семян клюквы четырехлепестной на испытанных питательных средах можно сократить период морфофизиологического покоя и добиться их ускоренного прорастания в течение трех дней.

*Ключевые слова:* биотехнология растений, сельскохозяйственные ягодные растения, питательные среды, морфогенез, регенеранты.

The article studies the influence of agarized nutritious Murashige and Skoog medium of various modifications and Anderson liquid medium on germination of isolated seeds of berry and fruit crops - northern highbush blueberry and large cranberry. The most expressed stimulating effect of highbush blueberry was observed in agarized Murashige and Skoog medium with addition of gibberellins (1.5 mg/l). For large cranberry, agarized nutritious Murashige and Skoog medium with addition of gibberellins (2.0 mg/l) appeared the most optimal, which is testified by morphometric indicators of germs. It is established that in cultivating the seeds of highbush blueberry of the sorts Blueray and Dixie and the seeds of large cranberry on the tested nutritious mediums, it is possible to accelerate the period of morpho-physiologic rest and achieve their accelerated germination during three days.

*Keywords:* plants biotechnology, agricultural berry plants, nutritious mediums, morphogenesis, regenerants.

**Введение.** В настоящее время биотехнология является научной основой производства сельскохозяйственной продукции. Биотехнология растений позволяет осуществить использование растительного материала (семян, зародышей, верхушечных почек, побегов) для решения технологических задач. Практическая ее значимость заключается в ускоренном получении регенерантов, а затем и посадочного материала на оптимально подобранных питательных средах.

Сельскохозяйственные ягодные растения (голубика высокорослая, клюква четырехлепестная) вызывают большой интерес как полезный продукт питания и лекарственное сырье. Но на их вегетативное (черенкование) и семенное размножение уходит много времени, а выращенные растения нередко поражены болезнями. Ускоренно этот процесс происходит при получении стерильных регенерантов в культуре *in vitro*. В связи с этим наряду с существующими технологиями семенного размножения (стратификация), занимающими продолжительное время,

возникла необходимость разработки биотехнологических приемов, позволяющих обеспечить ускоренное массовое получение посадочного материала ценных сортов сельскохозяйственных ягодных растений. Одним из них является клональное микроразмножение в культуре *in vitro* [1; 2; 5]. Практическая значимость этой технологии заключается в ускоренном доразвитии зародышей и прорастании семян на оптимально подобранных питательных средах, обеспечивающих возможность получения проростков, затем и посадочного материала на протяжении всего года и в нужном объеме. Поэтому были предприняты научные исследования по клональному микроразмножению *Vaccinium corymbosum* L. (голубика высокорослой) и *Oxycoccus quadripetalus* Gilib. (клюквы четырехлепестной), которые проводились в лаборатории биотехнологии Центрального ботанического сада НАН Беларуси [1–4].

Цель исследования заключалась в выявлении способности к ускоренному доразвитию зародышей и прорастанию семян голубики высокорос-

лой (сорта Блюрей и Дикси) и клюквы четырехлепестной, обладающих глубоким покоем, на оптимально подобранной питательной среде, в течение нескольких дней и в ускоренном получении регенерантов *in vitro*.

**Методы исследования.** В решении проблемы культивирования любого растительного материала *in vitro* сложность представляет экспериментальный подбор стерилизующих веществ и состава питательных сред. Стерилизация семян достигалась путем погружения их в диоксид на 20 мин с последующим промыванием в четырех сменах бидистиллированной воды; затем – в 70 % спирт на 10 мин с применением аналогичного промывания.

После стерилизации семена освобождались от внешней оболочки и высевались на агаризованную питательную среду Мурасиге – Скуга (MS) различных модификаций и на жидкую среду Андерсена (таблицы 1, 2). Биотехнологические манипуляции проводились в стерильном боксе.

Автоклавирование питательных сред проводили при 1 атм в течение 20 минут. Подбор оптимальной pH регулировали с помощью КОН и HCl в диапазоне от 4,0 до 5,8. На питательную среду помещалось по 100 эксплантов, эксперимент проводился в трехразовой повторности. Часть семян высевалась в чашки Петри без питательной среды как контрольный вариант. Регулярно проводился учет проросших семян от общего количества помещенных в чашки Петри. Фиксировали также морфометрические показатели проростков (длина стебелька, корешка, листочка).

**Краткая характеристика сортов.** Североамериканский сорт голубики высокорослой Дикси имеет мощный раскидистый куст с крупными листьями, высотой 1,6–1,8 м. Его урожайность может достигать 4–8 кг ягод, хорошего качества и вкуса. Североамериканский сорт голубики высокорослой Блюрей имеет прямостоячий раскидистый куст, высотой 1,2–1,8 м. Урожай ягод с куста составляет 5–8 кг. Ягоды хорошего вкуса и качества.

**Результаты исследования.** Зародыш семени исследуемых объектов недоразвит, семена обладают глубоким морфофизиологическим покоем. Для доразвития зародыша и прорастания семян голубики высокорослой и клюквы четырехлепест-

ной требуется продолжительная холодная стратификация [4].

После выдерживания семян голубики высокорослой в чашках Петри на холоде при температуре от 1 до 5 °С в течение четырех месяцев наблюдалось их единичное прорастание. При воздействии пониженных температур через 45 дней наблюдалось прорастание 70,5 % семян *Oxycoccus quadripetalus* Gilib., полученных из Новосибирского ботанического сада после их непродолжительного хранения (2,5 месяца). Только после трех месяцев стратификации семян клюквы четырехлепестной при температуре от 1 до 5 °С наблюдалась их стопроцентная всхожесть. В связи с вышеизложенным возникла необходимость подбора состава питательных сред для культивирования изолированных от покровов семян изучаемых хозяйственно-полезных культур и выявления оптимальных физических факторов для ускоренного получения регенерантов. Экспериментально подобраны оптимальная температура, освещенность и влажность воздуха для клонального микроразмножения исследуемых культур. Оптимальная температура в ростовой климатоканере составила 25 °С, круглосуточное флюоресцентное освещение – 3000 лк, влажность воздуха – 76 %.

Исследования показали, что основная масса семян голубики высокорослой (72 %) проросла на питательной среде за три дня, что важно для получения эффекта ускоренного размножения. Как видно из таблицы 1, оптимальной для ускоренного получения проростков голубики высокорослой обоих сортов оказалась среда в третьем варианте опыта, в котором имели место основная среда Мурасиге – Скуга со следующими добавками (мг/л): БАП – 0,5; ИУК – 1,0; В1 – 0,1; аденин – 1,0 и 2 % сахароза. На питательной среде такого состава у обоих сортов за три дня проросло около 90 % семян.

Закладывались опыты по определению оптимального количества гиббереллина – фитогормона, природного регулятора роста растений, необходимого для быстрого прорастания семян как на агаризованной среде Мурасиге – Скуга, так и на жидкой среде Андерсена с 2 % сахарозой. В качестве добавок использовались: 0,5 мг/л БАП + 1,0 мг/л ИУК + 0,1 мг/л В1 + 1,0 мг/л аденин (таблица 2).

**Таблица 1 – Культивирование семян голубики высокой в зависимости от добавок, вносимых в питательную среду Мурасиге – Скуга (pH 5,8)**

Вариант опыта	Добавки к агаризованной среде Мурасиге – Скуга, мг/л	Количество семян			
		Сорт Дикси		Сорт Блюрей	
		Общее	Проросших	Общее	Проросших
1	2 % сахароза + 0,1 В1	300	0	300	0
2	6 % сахароза + 0,1 В1	300	120 ± 0,06	300	116 ± 0,04
3	2 % сахароза + 0,5 БАП + 1,0 ИУК + 0,1 В1 + 1,0 аденин	300	270 ± 0,08	300	264 ± 0,08
4	2 % сахароза + 0,5 БАП + 1,0 ИУК + 0,1 В1 + 1,0 аденин + 100 гидролизата казеина	300	0	300	0
5	Контроль	300	0	300	0

Примечание – БАП – 6-бензиламинопурин; ИУК – бета-индолилуксусная кислота; В1 – тиамин.

**Таблица 2 – Всхожесть семян голубики высокорослой в зависимости от дозы гиббереллина в течение трех суток (фон 0,5 мг/л БАП + 1,0 мг/л ИУК + 0,1 мг/л В1 + 1,0 мг/л аденин)**

Добавка гиббереллина, мг/л	Количество семян, шт на агаризованной среде Мурасиге – Скуга (рН 5,8)		Добавка гиббереллина, мг/л	Количество семян, шт на жидкой среде Андерсона (рН 4,8)	
	Общее	Проросших		Общее	Проросших
Сорт Дикси					
1,5	300	120 ± 0,15	1,5	300	60 ± 0,11
2,0	300	30 ± 0,10	2,0	300	0
3,0	300	60 ± 0,12	3,0	300	0
Контроль	300	0	Контроль	300	0
Сорт Блюрей					
1,5	300	116 ± 0,12	1,5	300	59 ± 0,11
2,0	300	27 ± 0,10	2,0	300	0
3,0	300	56 ± 0,11	3,0	300	0
Контроль	300	0	Контроль	300	0

**Таблица 3 – Морфометрические показатели проростков голубики высокорослой в культуре in vitro**

Питательная среда Мурасиге – Скуга (MS)	% прорастания семян	Длина проростков, мм (через 6 недель культивирования)		
		стебля	корня	листа
Сорт Дикси				
MS с гиббереллином (0,5 мг/л)	MS с гиббереллином (0,5 мг/л)	7,5 ± 0,02	2,4 ± 0,02	2,9 ± 0,03
MS с гиббереллином (1,5 мг/л)	MS с гиббереллином (1,5 мг/л)	9,6 ± 0,01	7,5 ± 0,03	4,2 ± 0,01
MS с гиббереллином (2,0 мг/л)	MS с гиббереллином (2,0 мг/л)	8,2 ± 0,02	5,0 ± 0,01	3,0 ± 0,01
MS с гиббереллином (3,0 мг/л)	MS с гиббереллином (3,0 мг/л)	5,0 ± 0,03	3,9 ± 0,02	2,7 ± 0,02
Контроль без гиббереллина	Контроль без гиббереллина	4,0 ± 0,01	1,2 ± 0,01	1,4 ± 0,01
Сорт Блюрей				
MS с гиббереллином (0,5 мг/л)	MS с гиббереллином (0,5 мг/л)	6,5 ± 0,02	3,5 ± 0,02	2,6 ± 0,03
MS с гиббереллином (1,5 мг/л)	MS с гиббереллином (1,5 мг/л)	8,6 ± 0,01	6,5 ± 0,03	4,1 ± 0,01
MS с гиббереллином (2,0 мг/л)	MS с гиббереллином (2,0 мг/л)	7,0 ± 0,02	4,0 ± 0,01	2,8 ± 0,01
MS с гиббереллином (3,0 мг/л)	MS с гиббереллином (3,0 мг/л)	4,8 ± 0,03	2,9 ± 0,02	2,9 ± 0,02
Контроль без гиббереллина	Контроль без гиббереллина	4,0 ± 0,01	1,2 ± 0,01	1,3 ± 0,01

Результаты опытов свидетельствуют о том, что максимальное количество проросших семян наблюдалось у обоих сортов в первом варианте опыта на обеих средах (Мурасиге – Скуга и Андерсона) при добавлении 1,5 мг/л гиббереллина (таблица 2) в течение трех дней (в обычных же условиях проращивания в чашке Петри семена голубики высокорослой обладают продолжительным периодом покоя и нуждаются в 4–5-месячной стратификации). Наблюдения за ростом и морфогенезом показали, что морфометрические показатели проростков также выше при культивировании на агаризованной среде Мурасиге – Скуга, в которую добавлен гиббереллин – 1,5 мг/л (таблица 3).

Таким образом, для прорастания семян голубики высокой обоих сортов оптимальной следует считать среду, которая включает макро- и микроэлементы по Мурасиге – Скуга с добавлением 0,5 мг/л БАП + 1,0 мг/л ИУК + 0,1 мг/л В1 + 1,0 мг/л аденина + 1,5 мг/л гиббереллина. Для практического применения можно также рекомендовать среду Мурасиге – Скуга с концентрацией гиббереллина 2,0 мг/л, поскольку активность прорастания семян на этой среде тоже высокая (таблица 3), а морфометрические показатели проростков близки к показателям вышеописанного варианта опыта, то есть при культивировании изолирован-

ных семян на питательной среде MS такого же состава с добавлением гиббереллина 1,5 мг/л.

Сравнительный анализ полученных данных об использовании питательных сред для ускоренного развития регенерантов голубики высокорослой с другими исследованиями [2] позволил выявить, что для развития иных типов эксплантов голубики высокорослой (эпикотиль, гипокотиль, семядольные листочки, корешок, апекс проростка) сортов Дикси и Блюрей, благоприятной питательной средой является агаризованная среда Андерсона с добавлением цито гормона 2 iP (2-изопентениладенина – 15 мг/л) и ИУК (3 мг/л).

Проблема клонального микроразмножения для голубики высокорослой может быть решена не только с помощью культивируемых семян, но и благодаря образованию каллусной ткани. На искусственной питательной среде каллусообразование наблюдалось при культивировании верхушечных почек, освобожденных от покровов (рисунок 1, фрагмент 1). Оптимальной для культивирования каллуса явилась среда Мурасиге – Скуга, с добавлением 1,5 мг/л гиббереллина, или среда Андерсона с добавлением 2-iP. Процесс морфогенеза сопровождался регулярными пересадками эксплантов на эти же, но свежеприготовленные питательные среды, через каждые 30 дней.



Рисунок 1 – Развитие регенерантов голубики высокорослой через 1,5 мес. культивирования (сорт Дикси) на агаризованной питательной среде Мурасиге – Скуга с добавлением 1,5 мг/л гиббереллина: 1 – из каллусной ткани; 2 – из семян, лишенных покровов

Из каллусной ткани также получены регенеранты (рисунок 1, фрагмент 1).

Наблюдение за развитием регенерантов из семян показало, что сорт голубики высокорослой «Дикси» на агаризованной питательной среде Мурасиге – Скуга с добавлением гиббереллина обладает большим морфогенетическим потенциалом по сравнению с сортом «Блюрей», поскольку изолированные от покровов семена проявляют более высокую способность к регенерации (таблица 2, рисунок 1, фрагмент 2) и морфометрические показатели проростков выше у сорта «Дикси» (таблица 3).

Выше отмечено, что семена клюквы четырехлепестной прорастают после трехмесячной стратификации. Как показали экспериментальные данные, в контроле, то есть без гиббереллина на оптимальной питательной среде Мурасиге – Скуга (MS), процент прорастания семян клюквы четырехлепестной низкий (таблица 4). Период прорастания семян длительный (составляет 50–60 дней и более). Морфометрические показатели регенерантов, учтенные через 50 дней (длина листа, стебля, корня), уступают таковым в вариантах опыта с добавлением гиббереллина (таблица 4). Морфогенез на питательной среде такого состава замедлен и число листовых зачатков на проростке отсутствует в течение двух месяцев по сравнению с вариантами опыта, где в качестве добавки использовался гиббереллин. Оптимальной для морфогенеза регенерантов клюквы четырехлепестной оказалась агаризованная питательная среда Мурасиге – Скуга с добавлением 2,0 мг/л гиббереллина, о чем свидетельствуют морфометрические показатели проростков (таблица 4).

Таблица 4 – Морфометрические показатели регенерантов (проростков) клюквы четырехлепестной в культуре in vitro

Длина стебля, мм	Длина корня, мм	Длина листа, мм	Время прорастания, дни	% прорастания семян	Количество листовых зачатков
Питательная среда Мурасиге – Скуга (MS) без гиббереллина (контроль)					
6,0 ± 0,01	2,2 ± 0,01	2,4 ± 0,01	50	20	–
Питательная среда Мурасиге – Скуга с гиббереллином (0,5 мг/л)					
9,1 ± 0,02	4,0 ± 0,03	2,9 ± 0,03	14	50	2
Питательная среда Мурасиге – Скуга с гиббереллином (1,5 мг/л)					
10,2 ± 0,02	6,8 ± 0,02	3,0 ± 0,01	7	56	2
Питательная среда Мурасиге – Скуга с гиббереллином (2,0 мг/л)					
12,6 ± 0,02	7,5 ± 0,01	4,2 ± 0,02	3	90	4
Питательная среда Мурасиге – Скуга с гиббереллином (3,0 мг/л)					
6,0 ± 0,03	3,9 ± 0,02	2,7 ± 0,02	30	24	1

При введении в питательную среду MS 2,0 мг/л гиббереллина длительность прорастания семян клюквы четырехлепестной резко сократилась и составила не более трех дней, а процент прорастания семян значительно увеличился (до 90 %). Морфогенез протекал более активно: на проростке сформированы четыре листочка. Повышение в питательной среде концентрации гиббереллина до 3,0 мг/л ведет к снижению морфометрических показателей регенерантов, уменьшению процента прорастания семян клюквы четырехлепестной, увеличению периода их прорастания и замедлению морфогенеза (таблица 4).

Таким образом, анализ терминов прорастания изолированных от покровов семян показал, что в культуре in vitro они прорастают значительно быстрее, за 3 дня по сравнению с семенами, которые культивируются в обычных условиях после периода стратификации (4 мес. и более). Данная биотехнология свидетельствует о возможности выключения морфобиологического покоя семян исследованных культур путем их культивирования in vitro на модифицированной питательной среде Мурасиге – Скуга. Она позволяет ускоренно получать проростки и посадочный материал ценных ягодных сельскохозяйственных культур на модифицированной питательной среде Мурасиге – Скуга с добавлением гиббереллина.

**Выводы.**

1. Процесс культивирования семян голубики высокорослой на питательной среде Мурасиге – Скуга (сорта Дикси и Блюрей) и клюквы четырехлепестной, изолированных от покровов, показал возможность снятия у них длительного периода покоя, поскольку на питательной среде семена прорастают в течение 3 дней.

2. Близкой к оптимальной для культивирования изолированных от покровов семян голубики высокорослой (сорта Дикси и Блюрей) оказалась питательная среда Мурасиге – Скуга, содержащая БАП (0,5 мг/л) + ИУК (1 мг/л) + тиамин (0,1 мг/л) + аденин (1 мг/л) + 2 % сахара.
3. Более высокие морфометрические показатели у регенерантов голубики высокорослой (длина стебелька, корешка, листочка) наблюдались у обоих сортов при добавлении в питательную среду Мурасиге – Скуга 1,5 мг/л гиббереллина.
4. Сорт голубики высокорослой Дикси характеризуется большими морфометрическими показателями проростков по сравнению с сортом Блюрей на оптимально подобранной питательной среде Мурасиге – Скуга.
5. Благоприятной для культивирования семян клюквы четырехлепестной оказалась питательная среда Мурасиге – Скуга, содержащая БАП (0,5 мг/л) + ИУК (1 мг/л) + тиамин (0,1 мг/л) + аденин (1 мг/л) + 2 % сахара + + гиббереллин 2,0 мг/л.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Морфогенез интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной и рододендрона желтого в зависимости от состава питательных сред / Е. Н. Кутас [и др.] // Весті НАН Беларусі. Сер. біял навук. – 2015. – № 1. – С. 12–15.
2. Черник, В. Ф. Регенерация растений из эксплантов стерильных проростков у двух интродуцированных сортов *Vaccinium corymbosum* L. / В. Ф. Черник, Е. Н. Кутас // Весті НАН Беларусі. Сер. біял навук. – 1992. – № 3–4. – С. 6–9.
3. Regeneration potential of different types of explants from introduced varieties of rhododendrons in aseptic culture / E. Kutas [etc.] // International Journal of Advanced Research in Biological Sciences. – 2016. – № 3 (6). – P. 1–4.
4. Николаева, М. Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян / М. Г. Николаева, М. В. Разумова, В. Н. Гладкова. – Л., 1985. – 276 с.
5. Черник, В. Ф. Разработка основ технологии микроклонального размножения *Vaccinium corymbosum* L. в культуре in vitro / В. Ф. Черник // Global science and innovations 2019: Central Asia : материалы VI Междунар. науч.-практ. конф., Нур-Султан, 10–12 мая 2019 г. / редкол.: Х. Б. Маслов [и др.]. – Нур-Султан, 2019. – Т. 5. – С. 37–41.

#### REFERENCES

1. Morfogenez introducirovannyh sortov golubiki vysokoj, brusniki obyknovennoj i rododendrona zheltogo v zavisimosti ot sostava pitatel'nyh sred / E. N. Kutas [i dr.] // Vesci NAN Belarusi. Ser. biyal navuk. – 2015. – № 1. – S. 12–15.
2. Chernik, V. F. Regeneraciya rastenij iz eksplantov steril'nyh prorstkov u dvuh introducirovannyh sortov *Vaccinium corymbosum* L. / V. F. Chernik, E. N. Kutas // Vesci NAN Belarusi. Ser. biyal navuk. – 1992. – № 3–4. – S. 6–9.
3. Regeneration potential of different types of explants from introduced varieties of rhododendrons in aseptic culture / E. Kutas [etc.] // International Journal of Advanced Research in Biological Sciences. – 2016. – № 3 (6). – P. 1–4.
4. Nikolaeva, M. G. Spravochnik po prorashchivaniyu pokoyashchihsiya semyan / M. G. Nikolaeva, M. V. Razumova, V. N. Gladkova. – L., 1985. – 276 s.
5. Chernik, V. F. Razrabotka osnov tekhnologii mikroklonal'nogo razmnozheniya *Vaccinium corymbosum* L. v kul'ture in vitro / V. F. Chernik // Global science and innovations 2019: Central Asia : materialy VI Mezhdunar. nauch.-prakt. konf., Nur-Sultan, 10–12 maya 2019 g. / redkol.: H. B. Maslov [i dr.]. – Nur-Sultan, 2019. – T. 5. – S. 37–41.