

УДК 58.085 : 634.739.2 : 634.738 : 634.737

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ НЕКОТОРЫХ ПОЛИПЛОИДНЫХ ФОРМ РОДА *VACCINIUM* L.

© 2019 Д.Н. Зонтиков, С.А. Зонтикова, К.В. Малахова, Э.В. Марамохин

Костромской государственной университет

Статья поступила в редакцию 20.02.2019

В работе показано влияние вида питательной среды и концентрации регуляторов роста на процесс клонального микроразмножения полиплоидных сортов и форм (селекционных образцов), полученных в результате селекционной работы на основе трех видов Клюква болотная (*Vaccinium oxycoccos* L.), Голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.) и Брусника (*Vaccinium vitis-idaea* L.) рода *Vaccinium* L.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, питательные среды, *Vaccinium oxycoccos* L., *Vaccinium corymbosum* L., *Vaccinium vitis-idaea* L.

Работа выполнялась при поддержке РФФИ (проект номер 18-416-44002 p_a)

Род *Vaccinium* L., включает в себя значительное количество видов, ягоды которых, используются человеком в пищу и при помощи селекции получены сорта для возделывания в культуре. Однако, наибольшее распространение получили три вида – это Клюква болотная (*Vaccinium oxycoccos* L.), Голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.) и Брусника (*Vaccinium vitis-idaea* L.), различные сорта, которых, выращиваются на ягодных плантациях [1, 2, 3]. Спрос на ягоды и сами растения этих культур постоянно растёт, об этом говорит появление новых сортов, закладка плантаций, селекционная работа, направленная на механизированную уборку Голубики [4, 5], создание новых сортов Клюквы [6, 7], исследования по плантационному выращиванию брусники [8]. Из-за специфики селекционного процесса и биологических особенностей получение посадочного материала производят вегетативным методом. Все эти растения как плантационные культуры начали активно использовать относительно недавно.

В различных американских и европейских изданиях есть описания специфики клонального микроразмножения видов рода *Vaccinium*, однако, из-за генетических особенностей сортов и видов (сорта клюквы американской селекции относятся к другому виду и отличаются по количеству хромосом), методов их получения, например ги-

бридизации разных видов *Vaccinium corymbosum* x *Vaccinium uliginosum*, по этим причинам методики клонального микроразмножения будут сильно различаться [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15].

Остается много проблемных вопросов по эффективности введения в культуру, составу питательных сред и регуляторов роста, мере активности ионов водорода в питательной среде. Исходя из этого цель нашей работы – подбор питательной среды и регуляторов роста, для размножения различных сортов клюквы болотной, голубики высокорослой и брусники в культуре *in vitro*.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе нами были использованы сорта клюквы болотной полученные селекционерами Центрально-европейской лесной опытной станции г. Костромы: Алая заповедная, Дар Костромы, Сазоновская, Краса Севера. Два сорта брусники костромской селекции – Костромичка, Костромская розовая и перспективный сеянец № 11. Три формы голубики – № 122, № 201, № 203, полученные от опыления сортов Норд Лэнд и Норд Кантри.

В качестве донорных эксплантов использовали метамеры побега с пазушными почками. Для снижения количества контаминации при введении в культуру *in vitro*, использовали молодые побеги возрастом до одного месяца, при этом сами растения находились в контролируемых условиях вегетационной комнаты, а побеги получали используя метод выгонки [16].

Метамеры длиной 5 мм с почкой в чашке Петри переносят в ламинарный бокс и стерилизуют в 70% водном растворе этанола в течение 1 минуты, после 15 минут стерилизуют в 5% водном растворе гипохлорита натрия или калия и

Зонтиков Дмитрий Николаевич, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник. E-mail: zontikovdn@mail.ru

Зонтикова Светлана Анатольевна, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры биологии и экологии. E-mail: antenaria@mail.ru

Малахова Ксения Вячеславовна, аспирант.

Марамохин Эдуард Владимирович, ассистент кафедры биологии и экологии, аспирант.

промывают в трех сосудах со стерильной водой, объемами не менее 100 мл. После стерилизации скальпелем отсекаем лишние ткани побега, оставляя только узел с почкой, который сажаем на питательные среды.

Технология клонального микроразмножения включает в себя несколько этапов, на каждом из которых меняется состав питательной среды и используемые регуляторы роста [17]. При введении в культуру *in vitro* для активации пазушных меристем нами использовалась питательная среда WPM [18], дополненная 100 мг/л мезоинозита, 2 мг/л глицина, 0,5 мг/л тиамина, 0,5 мг/л пиридоксина, 20 г/л сахарозы и 5,0 г/л агара, pH 4,5. В качестве регуляторов роста использовали 2-изопентиладенин в концентрации 5 мг/л и β -индолилуксусную кислоту в концентрации 0,5 мг/л.

На этапе введения в культуру *in vitro*, нами исследовался вид питательной среды подходящий для отобранных сортов и форм, регуляторы роста при этом были подобраны по литературным источникам, отдавая предпочтение наиболее часто используемым [9, 10, 11, 12]. Для изучения влияния состава питательной среды и регуляторов роста на активацию пазушных меристем на этапе элонгации и микрочеренкования, нами использовались питательные среды: Andersona и WPM [12, 18]. В состав питательных сред были включены 100 мг/л мезоинозита, 2 мг/л глицина, 0,5 мг/л тиамина, 0,5 мг/л пиридоксина, 20 г/л сахарозы и 5,0 г/л агара. Уровень pH питательной среды измерялся при помощи стационарного pH-метра Hanna HI-2210 после добавления всех компонентов, кроме агара, и доводился до значения 4,0-4,8. В качестве регуляторов роста для геммогенеза использовались 2-изопентиладенин в концентрациях для клюквы от 1 до 5 мг/л, голубики от 6 до 14 мг/л, брусники от 1 до 5 мг/л, в этом опыте деление на сорта не проводили.

Культивирование растений-регенерантов проводили при освещении 1500 Лк и периоде 16 ч (день)/8 ч (ночь) при температуре не выше 25°C. На этапе введения в культуру *in vitro* использовали стеклянные культуральные сосуды, объемом 10 мл. На этапе элонгации, микрочеренковании и укоренения использовали пластиковые одноразовые сосуды объемом 100 мл, в каждом сосуде было 50 мл питательной среды и от 180 до 250 растений-регенерантов. Каждый пассаж клонального микроразмножения проводили через 45 суток, к этому времени побеги в культуральных сосудах достигали высоты: клюква 5-7 см, голубика 4-5 см, брусника 3-4 см.

Фотографирование растущих в культуре *in vitro* растений-регенерантов проводили с использованием цифровой камеры «Samsung». Статистическую обработку данных проводи-

ли по стандартным методикам при помощи Microsoft Excel и Matrix.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке влияния различных питательных сред на активность морфогенеза в момент введения в культуру *in vitro*, в качестве основных показателей, по которым проводили анализ, нами использовались такие как – число образовавшихся почек на одном экспланте, начало геммогенеза, так же проводили оценку появления витрифицированных побегов. В опыте по влиянию вида используемой питательной среды на морфогенез трёх сортов клюквы было установлено, что из двух взятых для работы питательных сред, все три сорта на питательной среде Andersona начинали расти уже на 22-23 сутки и образовывали большее число побегов в лучших вариантах, в то время как на питательной среде WPM, процесс образования новых побегов происходил на 24 сутки с образованием меньшего числа побегов (табл. 1).

В аналогичном предыдущему опыте только с тремя формами голубики, было установлено, что для отобранных форм голубики по всем показателям предпочтительнее использование питательной среды WPM. В лучшем варианте, побегообразование начиналось уже на 27 сутки и через 40 суток культивирования получали по 2,8 побегов на эксплант (табл. 2).

При работе с донорными эксплантами брусники нами было установлено, что для введения в культуру необходимо использовать питательную среду Andersona, при использовании на этапе введения этой питательной среды удалось добиться начала роста на 27-30 сутки, а к 40 суткам культивирования в лучшем варианте эксперимента образовывалось по 3,2 почки на эксплант.

В работах посвящённых размножению голубики и клюквы содержатся различные данные об используемых регуляторах роста, на основе предыдущего опыта нами было установлено положительное влияние на морфогенез регулятора роста 2-изопентиладенина (2-ip). Нами проводился опыт по определению разных концентраций этого регулятора роста на активность морфогенеза при клональном микроразмножении. В результате было установлено, что большее число побегов и метамеров клюква образовывала на питательной среде с концентрацией 2-ip составляющим 3 мг/л, голубика – 8 мг/л; брусника 4 мг/л (табл. 4).

Клональное микроразмножение представителей рода проводили через каждые 45-50 суток, к этому времени побеги достигали высоты 4-6 см и имели от 5 до 9 узлов. В результате опыта была установлена чёткая зависимость в первую очередь скорости роста микрорастений от уровня

Таблица 1. Влияние вида используемой питательной среды на морфогенез клюквы, сахара 20 г/л, pH 4,8

Сорт	Питательная среда	Регулятор роста, мг/л	Начало роста побегов, сутки		Среднее число образ. побегов, через 40 суток, шт.		Витрификация, %	
			$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %	$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %	$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %
Алая заповедная	Andersona	БАП 0,5	23±2	6,3	1,2±0,2	6,7	2,0±0,1	6,0
		2-ip 1,0	22±1	4,1	2,3±0,1	8,0	0	0
		Зеатин 1,0	22±1	10,1	2,1±0,2	9,1	0	0
Дар Костромы		БАП 0,5	24±2	7,1	1,9±0,1	10,2	3,2±0,1	2,3
		2-ip 1,0	22±2	9,4	2,2±0,1	9,3	0	0
		Зеатин 1,0	24±1	8,9	2,0±0,1	11,1	0	0
Сазоновская		БАП 0,5	25±2	11,0	1,3±0,2	9,7	4,3±0,1	13,6
		2-ip 1,0	23±1	9,0	2,9±0,2	12,0	0	0
		Зеатин 1,0	24±2	13,4	2,1±0,2	9,5	0	0
Алая заповедная	WPM	БАП 0,5	27±3	17,2	0,9±0,1	5,2	5,0±0,2	12,3
		2-ip 1,0	24±3	3,5	1,2±0,1	12,1	0	0
		Зеатин 1,0	26±2	3,7	1,3±0,2	4,3	0	0
Дар Костромы		БАП 0,5	30±2	2,1	1,0±0,2	7,4	3,2±0,1	4,2
		2-ip 1,0	25±1	4,7	1,5±0,1	8,3	0	0
		Зеатин 1,0	25±2	14,2	1,4±0,2	2,2	0	0
Сазоновская		БАП 0,5	27±2	10,7	1,1±0,2	3,9	5,1±0,1	5,2
		2-ip 1,0	24±1	3,2	1,3±0,2	4,2	0	0
		Зеатин 2,0	24±2	5,7	1,6±0,5	6,8	0	0

Таблица 2. Влияние вида используемой питательной среды на морфогенез форм голубики, используемых в работе, сахара 20 г/л, pH 4,8

Форма	Питательная среда	Регулятор роста, мг/л	Начало роста побегов, сутки		Среднее число образ. побегов, через 40 суток, шт.		Витрификация, %	
			$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %	$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %	$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %
122	Andersona	БАП 0,5		4,3	1,1±0,1	3,2	13±0,7	1,1
		2-ip 10	32±1	7,8	1,4±0,1	7,2	0	0
		Зеатин 5,0	36±2	6,4	1,4±0,3	9,3	0	0
201		БАП 0,5	38±3	6,6	1,3±0,1	14,6	9±0,8	5,6
		2-ip 10	33±1	9,0	1,5±0,1	4,5	0	0
		Зеатин 5,0	35±2	3,2	1,7±0,1	6,2	0	0
203		БАП 0,5	35±1	8,2	1,2±0,1	2,3	12±0,2	4,5
		2-ip 10	32±2	10,3	1,6±0,1	1,2	0	0
		Зеатин 5,0	36±1	3,7	1,5±0,1	2,7	0	0
122	WPM	БАП 0,5	35±2	4,1	1,5±0,1	2,3	7±0,8	3,9
		2-ip 10	30±1	2,9	2,5±0,1	4,9	0	0
		Зеатин 5,0	33±1	4,5	2,3±0,1	6,1	0	0
201		БАП 0,5	37±1	9,4	2,2±0,1	9,3	8±0,7	
		2-ip 10	29±2	7,3	2,8±0,1	2,7	0	0
		Зеатин 5,0	34±1	1,8	2,4±0,1	3,2	0	0
203		БАП 0,5	36±1	9,0	1,7±0,2	4,0	11±0,1	3,6
		2-ip 10	27±2	7,5	2,5±0,1	7,4	0	0
		Зеатин 5,0	35±1	3,2	2,2±0,1	4,5	0	0

Таблица 3. Влияние вида используемой питательной среды на морфогенез брусники, сахара 20 г/л, рН 4,8

Сорт/форма	Питательная среда	Регулятор роста, мг/л	Начало роста побегов, сутки		Среднее число образ. побегов, через 40 суток, шт.		Витрификация, %	
			$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %	$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %	$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %
Костромичка	Andersona	БАП 0,5	35±2	3,2	1,9±0,2	9,0	4±0,7	3,4
		2-ip 2,0	28±1	4,7	2,9±0,2	5,2	0	0
		Зеатин 4,0	31±2	6,5	2,4±0,1	3,9	0	0
Костромская розовая		БАП 0,5	34±1	3,9	2,1±0,1	1,3	7±0,5	5,6
		2-ip 2,0	27±2	6,4	3,0±0,1	3,6	0	0
		Зеатин 4,0	31±1	2,3	2,4±0,1	5,7	0	0
№ 11		БАП 0,5	35±1	10,1	1,9±0,3	2,9	5±0,5	7,6
		2-ip 2,0	30±1	5,2	3,2±0,2	7,4	0	0
		Зеатин 4,0	32±1	6,1	2,2±0,5	3,1	0	0
Костромичка	WPM	БАП 0,5	36±3	2,1	1,5±0,1	4,6	9±0,3	5,7
		2-ip 2,0	33±2	4,3	2,0±0,1	5,7	0	0
		Зеатин 4,0	33±2	7,4	2,2±0,5	10,1	0	0
Костромская розовая		БАП 0,5	37±4	10,3	1,4±0,2	5,9	4±0,7	4,3
		2-ip 2,0	30±2	5,2	2,5±0,3	3,4	0	0
		Зеатин 4,0	34±3	4,6	2,4±0,3	7,4	0	0
№ 11		БАП 0,5	35±2	3,5	2,1±0,3	7,8	12±0,2	13,5
		2-ip 2,0	33±2	7,1	2,3±0,2	8,1	0	0
		Зеатин 4,0	34±2	3,9	2,3±0,1	4,5	0	0

Таблица 4. Влияние концентрации регулятора роста 2-изопентиладена (2-ip) на морфогенез видов используемых в работе, голубика на питательной среде WPM, брусника и клюква – Andersona, сахара 20 г/л

Концентрация регулятора роста 2-ip, мг/л	Начало роста побегов, сутки		Среднее число образ. побегов, через 40 суток, шт.		Среднее число метамеров в побеге, через 40 суток, шт.	
	$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %	$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %	$\bar{x} \pm S_x$	C.V., %
Клюква						
1 (контроль)	17±2	3,5	2,1±0,2	5,6	3,0±0,1	3,2
2	16±2	7,0	2,1±0,1	4,1	5,1±0,1	5,1
3	11±1	3,2	2,5±0,1	2,3	7,4±0,2	4,5
4	13±1	4,7	2,2±0,2	3,4	6,2±0,1	4,1
5	15±1	6,4	2,3±0,3	2,3	5,1±0,2	3,9
Голубика						
6	22±1	4,5	3,1±0,2	1,2	0,9±0,1	2,4
8	20±1	5,2	3,5±0,3	2,5	1,5±0,2	5,3
10 (контроль)	24±2	3,1	3,3±0,3	4,3	1,3±0,1	2,1
12	25±2	7,9	2,9±0,2	5,1	1,0±0,2	4,0
14	25±4	6,7	2,4±0,2	4,9	0,6±0,2	3,4
Брусника						
1	20±1	6,6	2,2±0,2	8,2	2,1±0,1	3,5
2 (контроль)	17±2	5,8	2,4±0,1	7,9	2,2±0,1	3,9
3	17±1	6,1	3,1±0,1	9,1	2,4±0,1	9,7
4	16±2	4,7	4,2±0,2	2,5	3,1±0,1	2,6
5	18±2	8,9	2,8±0,3	11,9	2,9±0,1	3,5

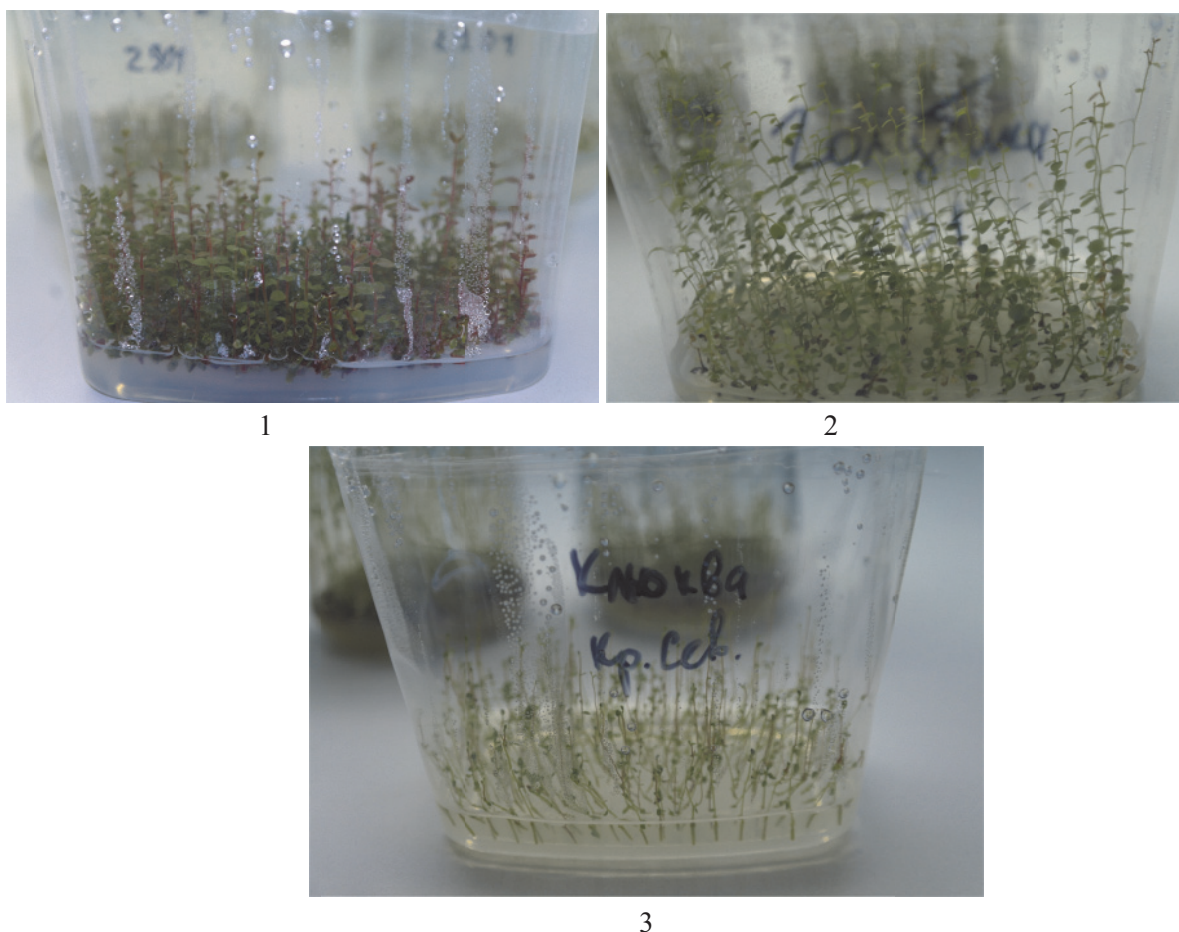


Рис 1. Культивирование Брусники (1), Голубики (2) и Клюквы (3) на питательных средах с оптимальным составом для культивирования

pH (табл. 4, рис.1). Таким образом, наиболее перспективной питательной средой для индукции морфогенеза и клонального микроразмножения трех сортов *Vaccinium oxycoccos* L. была питательная среда Andersona содержащая 2-ип в концентрации 3 мг/л ; для трёх селекционных образцов *Vaccinium corymbosum* L. – WPM, дополненная 2-ип в концентрации 8 мг/л; для *Vaccinium vitis-idaea* L. питательная среда Andersona, дополненная 2-ип в концентрации 4 мг/л.

Выполненные исследования по клональному микроразмножению девяти селекционных образцов рода *Vaccinium* L., можно использовать для получения посадочного материала данных культур при создании ягодных плантаций, а уже имеющийся материал в селекционной работе по созданию новых сортов и гибридов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. American Society of Agricultural Engineers. 2002. American Society of Agricultural Engineers Standards Yearbook. Russell H.Hahn and Evelyn E. Rosentreter (Eds.). St. Joseph, MO, 41st. edition.
2. California Chapter of the American Society of Farm Managers and Rural Appraisers. 2008. Trends in Agricultural Land and Lease Values. California Chapter of the American Society of Farm Managers and Rural Appraisers, Inc. Woodbridge, CA.
3. Bervejillo, Jose E., Manuel Jimenez, and Karen Klonsky. 2002. Sample Cost to Produce Fresh Market Blueberries, San Joaquin Valley South, Tulare County. University of California Cooperative Extension, Davis, CA.
4. S.P. Vander Kloet, "The Genus *Vaccinium* in North America," Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, 1988, p. 1828.
5. Pliszka K. New Polish highbush blueberry selections (*Vaccinium corymbosum* L.)//Fourth international Symposium on *Vaccinium* culture: Abstract. East Lansing - Madison, 1988, P.32.
6. Сидорович Е.А., Рубан Н.Н., Шерстеникина А.В. Интродукция и опыт выращивания клюквы крупноплодной, голубики высокорослой и брусники/ Обзор.информ. Минск: БелНИИТИ.1991.- 53 с.
7. Макеев В.А., Черкасов А.Ф., Макеева Г.Ю. Некоторые результаты интродукции клюквы крупноплодной и болотной // Материалы III Международной конференции «Интродукция нетрадиционных и редких сельскохозяйственных растений». Т.1. Пенза, 2000. - С. 177-179.
8. Тяк Г.В., Черкасов А.Ф., Алтухова С.А. Брусника новая перспективная культура // Сб.докл. и выступл. На Международной науч.-метод.конф.»Новые сорта и технологии возделывания плодовых и ягодных культур для садов интенсивного типа». Орёл, 2000. - С. 240-241.
9. Debnath SC (2004) In vitro culture of lowbush

- blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Small Fruits Rev.* 3: 393-408.
10. S. C. Debnath, "A Scale-Up System for Lowbush Blueberry Micropropagation Using a Bioreactor," *HortScience*, Vol. 44, No. 7, 2009, pp. 1962-1966
 11. Debnath S.C., McRae K.B., 2001b. In vitro culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.): The influence of cytokinins and media types on propagation. *Small Fruits Review*, 1: 3-19.
 12. Anderson W.C., 1980. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*. *Acta Horticulturae*, 112: 13-20.
 13. Sedlák J., Paprštein F., 2009. In vitro multiplication of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Horticulturae*, 810: 575-580.
 14. Ahokas, H. 1995. Is the polyploid cranberry (*Vaccinium* sp.) in Finland tetraploid or hexaploid. *Nordic Journal of Botany* 16: 185-189.
 15. Bruederle, L. P., M. S. Hagan, J. M. Dignan, and N. Vorsa. 1996. Genetic variation in natural populations of the large cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. (Ericaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 123: 41-47.
 16. Зонтиков Д.Н., Зонтикова С.А., Сергеев Р.В. Размножение высокопродуктивных диплоидных и триплоидных форм осины (*Pyrulus tremula* L.) в культуре in vitro// *Агрехимия*. 2016. №7. С. 59-65.
 17. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Наука, 1990. 176 с.
 18. Lloyd G., McCown B., 1981. Commercially-feasible micro-propagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society*, 30: 421-427.

**INFLUENCE OF THE COMPOSITION OF NUTRITIONAL MEDIA
AND GROWTH REGULATORS DURING CLONAL MICROPROPAGATION
OF SOME POLYLIPOID FORMS OF THE GENUS *VACCINIUM* L.**

© 2019 D.N. Zontikov, S.A. Zontikova, K.V. Malahova, E.V. Maramohin

Kostroma State University

The paper shows the influence of the type of nutrient medium and the concentration of growth regulators on the process of clonal micropropagation of polyploid varieties and forms (selection samples) obtained as a result of selection work based on three species Cranberry marsh (*Vaccinium oxycoccos* L.), Blueberry tall (*Vaccinium corymbosum* L.) and Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) of the genus *Vaccinium* L.
Keywords: clonal micropropagation, nutrient media, *Vaccinium oxycoccos* L., *Vaccinium corymbosum* L., *Vaccinium vitis-idaea* L.

Dmitry Zontikov, Candidate of Agricultural Sciences, Senior Researcher. E-mail: zontikovdn@mail.ru

Svetlana Zontikova, Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor of the Department of Biology and Ecology. E-mail: antennaria@mail.ru

Ksenia Malakhova, Graduate Student.

Eduard Maramokhin, Assistant Lecturer of the Department of Biology and Ecology, Graduate Student.