

Турдиев Т.Т., Ковальчук И.Ю.,
Успанова Г.К., Чуканова Н.И.,
Фролов С.Н.

**Оптимизация технологии
клонального
микроразмножения
для сохранения генофонда
растений груши (*P. communis* L.)**

Turdiyev T.T., Kovalchuk I.Yu,
Uspanova G.K., Chukanova N.I.,
Frolov S.N.

**Optimization of
micropropagation for pear gene
pool preservation**

Турдиев Т.Т., Ковальчук И.Ю.,
Успанова Г.К., Чуканова Н.И.,
Фролов С.Н.

**Алмұрт генқорын сақтау үшін
клондық микроекөбейтуді оң-
тайландыру**

Определены стерилизующие препараты и их концентрации для дезинфекции эксплантов от сапрофитной микрофлоры, оптимизирован состав питательных сред для введения в культуру *in vitro* и клонального микроразмножения груши. Экспланты эффективно стерилизовать одним из антисептиков: а) $HgCl_2$ 0,1% в экспозиции 10-15 мин; б) «Доместос» без разведения – 3 мин. Для введения в культуру *in vitro* эксплантов груши оптимальна среда МС, содержащая ИМК-0,1 мг/л, ГК-0,5 мг/л, а для микроклонального размножения – среда МС, с БАП-0,6 мг/л; ИМК-0,1 мг/л; ГК-0,2 мг/л; сахарозой-30 г/л. На искусственных питательных средах *in vitro* размножено 23 сорта груши (*P. communis* L.) и 2 дикорастущие формы (*P. pyraster* L., *P. regelii* Rehd). Коэффициент размножения колебался от 8 до 9 в зависимости от генотипа.

Ключевые слова: груша (*P. communis* L.), питательные среды, клональное микроразмножение, культура тканей, апекс, эксплант.

Sterilizing agents and their concentrations for the disinfection of explants from saprophyte microflora were identified, the composition of nutrient media was specified that is optimal for introduction of pear into *in vitro* culture and micropropagation. Explants should be effectively sterilized with one of antiseptics: a) $HgCl_2$ 0.1% in the exposure of 10-15 min; b) «Domestos» without dilution – 3 min. The content in MS medium with GA-0.5 mg/l, IBA-0.1 mg/l is optimal for the introduction of pear into *in vitro* culture. MS medium containing BAP-0.6 mg/l; IBA-0.1 mg/l; GA-0.2 mg/l; sucrose-30 g/l is optimal for propagation of pear explants in the *in vitro* culture.

Key words: pear, nutrient media, micropropagation, tissue culture, apex, explant.

Алмұрт сорттарының сапрофиттік микрофлорадан тиімді зарарсыздандырылу тәсілі тағайындалды, және оңтайлық жасанды қоректік орталарына *in vitro* және микроекөбейту өсімдіктері енгізілді. Көшектерді тиімді зарарсыздандыру үшін мына антисептиктердің біреуін қолданады: а) $HgCl_2$ 0,1% экспозицияда 10-15 мин; б) «Доместос» сусыз – 3 мин. Алмұрт өсімдіктерді *in vitro* жағдайына еңгізу үшін тиімді МС қоректік орталарда ГК-0,5 мг/л, ИМК-0,1 мг/л болу керек. Алмұрт экспланттардың микроекөбейту үшін тиімді жасандық қоректік орта МС және гармондар: БАП-0,6 мг/л; ИМК-0,1 мг/л; ГК-0,2 мг/л; сахароза-30 г/л.

Түйін сөздер: алмұрт, қоректік орталар, микроклондап көбейту, ұлпаларды өсіру, апекс, эксплант.

**ОПТИМИЗАЦИЯ
ТЕХНОЛОГИИ
КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ
ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ
ГЕНОФОНДА
РАСТЕНИЙ ГРУШИ
(*P.communis* L.)**

Введение

В мире давно проводятся исследования по криоконсервации и хладохранению гермоплазмы и создаются криобанки растений.

Для проведения исследований по криосохранению, прежде всего, необходимо ввести в культуру *in vitro* и размножить достаточное количество растительного материала, что позволит получать материал для исследований по криоконсервации круглый год независимо от сезона, оздоравливать его от вирусной и микоплазменной инфекции [1, 2, 3].

Поэтому клональное микроразмножение является особенно важным этапом в биотехнологической системе сохранения генофонда плодовых культур. Применяя технику клонирования *in vitro*, заключающуюся в размножении растений в асептических условиях (пробирках, колбах, и т.д.) на специально подобранных питательных средах, можно значительно ускорить размножение посадочного материала, достигающего 10^5 - 10^6 мериклонов в год, при 5-50 растений от одного, обычно получаемых за этот же срок традиционным методом. Используя асептическую пробирочную культуру, можно оздоровить посадочный материал от вредителей и болезней и размножить его для закладки плантаций [4, 5, 6], а также депонировать в условия, замедляющие рост (хладохранение) или полностью блокирующие метаболические процессы (криоконсервация).

Целью работы являлась оптимизация клонального микроразмножения растений груши, заключающиеся в совершенствовании условий стерилизации тканей от сапрофитной микрофлоры и подбора состава питательных сред для введения в культуру *in vitro* и клонирования асептических растений.

Материалы и методы

Объектами исследования для введения и размножения в культуре *in vitro* груши являлись стародавний казахстанский сорт Талгарская Красавица и новый сорт казахстанской селекции Нагима.

Оптимизацию условий введения в культуру *in vitro* груши

проводили путем выделения апексов из верхушек побегов, а также терминальных и латеральных почек черенков и посадки их на искусственные питательные среды. Верхушки активно растущих побегов с меристематической зоной или почки отчленили, промывали в мыльном растворе, ополаскивали в дистиллированной воде. Затем погружали в стерилизующий раствор с различной концентрацией и экспозицией. После чего промывали 3 раза в стерильной воде и высаживали на питательную среду с соответствующими добавками. Культивирование и приготовление питательной среды проводили по методике Калинина Ф.Л. и др. [7].

Изучали эффективность использования различных стерилизующих препаратов для ингибирования роста сапрофитной микрофлоры при введении в асептическую культуру. Испытывали в качестве антисептиков – отбеливатели «АСЕ», «Белизна», «Доместос» и растворы 0,1% HgCl_2 и H_2O_2 в нескольких концентрациях и экспозициях.

Для выявления латентной инфекции базальную часть апексов высаживали на провокационную питательную среду VISS [8] и инкубировали 1-3 недели в чашках Петри в светокультуральной комнате при температуре 23-25°C, таким образом выявляется большинство внутренних системных инфекций.

Оптимизацию состава питательных сред для введения в культуру *in vitro* и клонального микроразмножения проводили на основе среды Мурасиге и Скуга (МС) с различными регуляторами роста: 6-бензиламинопурин (БАП), β -индолил-3-масляная кислота (ИМК), β -индолилуксусная кислота (ИУК) и гибберелловая кислота (ГК) в различных концентрациях.

Питательные среды в культуральных сосудах стерилизовали путем автоклавирования в течение 30 мин при давлении 1,0 атм. Асептические растения культивировали в светокультуральной комнате при температуре +23-25°C, освещённости $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16-часовом фотопериоде. Наблюдения и учёт проводили ежемесячно. Учитывали состояние и число образовавшихся побегов. Коэффициент размножения, средний за 1 пассаж для каждого генотипа, вычисляли по формуле: $P = a/10b \cdot c$; (a – количество вновь образовавшихся побегов; b – количество побегов, высаженных для размножения; c – количество пассажей).

Результаты и их обсуждение

Эффективность освобождения эксплантов от инфекции и их дальнейшее развитие зависело от типа стерилизующего агента, а также сортовых особенностей. В результате проведённых экспериментов было определено, что при стерилизации сортов и диких форм груши наибольшее количество регенерирующих побегов (60-75,0%) наблюдается при обработке 0,1% раствором HgCl_2 в экспозиции 10-15 мин. Полученные результаты соответствуют имеющимся литературным данным, где при введении в культуру *in vitro* эксплантов груши минимальный процент заражения был, также достигнут при использовании 0,1%-й HgCl_2 и сочетания перекиси водорода и HgCl_2 . Средняя регенерация эксплантов колебалась от 57,6% до 72,4% в зависимости от генотипа [9]. Однако последующие, проведённые нами эксперименты показали, что этот ртутьсодержащий препарат можно успешно заменить на менее опасный хлорсодержащий – «Доместос» (без разведения стерилизация в течении 3 мин). При применении этого отбеливателя, в качестве стерилизующего препарата, регенерация асептических растений груши в зависимости от генотипа составляет в среднем 65,0% (рисунок 1).

С целью оптимизации состава питательных сред для инициации роста верхушек побегов груши в культуре *in vitro* проводили испытание различных регуляторов роста и их концентраций на основе среды МС. Установлено, что для введения в культуру *in vitro* груши оптимально содержание в среде МС – ИМК-0,1 мг/л и ГК-0,5 мг/л. Увеличение в среде ГК до 0,7 мг/л снижает процент регенерирующих побегов. В качестве источника углеводов эффективно использовать сахарозу, применение глюкозы приводит к гибели апексов и регенерация происходит только у 17% побегов. Присутствие в среде МС ИУК непригодно для введения в культуру *in vitro*. В этом случае у основания растений происходит обильное образование каллусной ткани (рисунок 2).

Отсутствие в среде БАП и глицина, а также замена ИУК на ИМК способствует инициации роста побегов груши при помещении на питательную среду. Следует отметить, что присутствие в питательной среде ГК стимулирует увеличение числа жизнеспособных растений (рисунок 3).

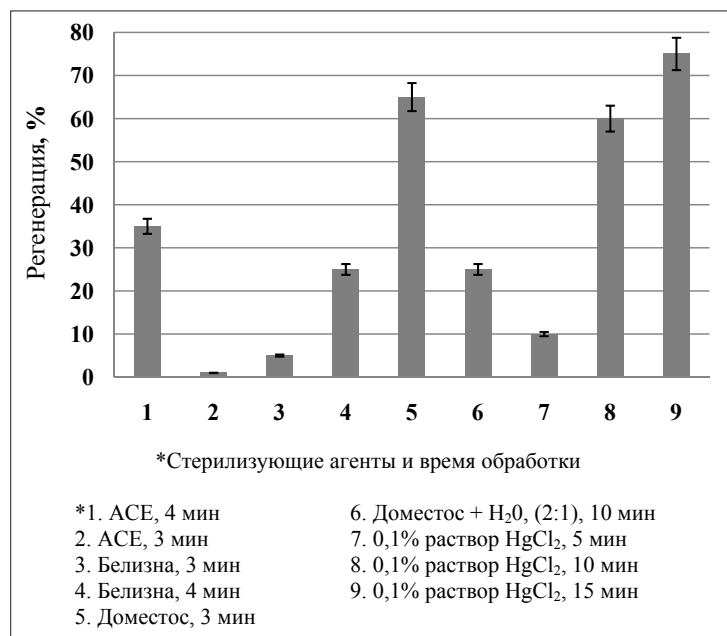
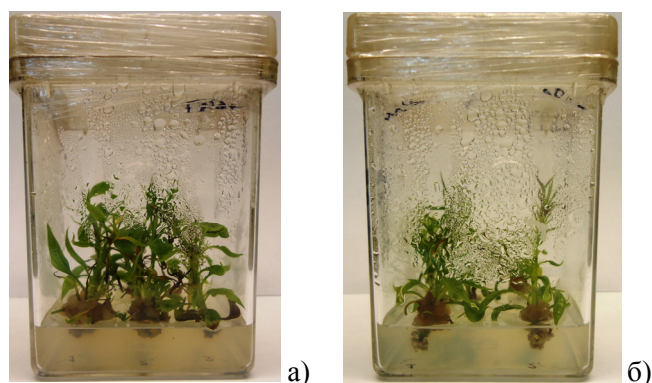


Рисунок 1 – Влияние стерилизующих агентов и их времени обработки на введение груши в культуру *in vitro*



а) сорт Талгарская Красавица, б) сорт Нагима

Рисунок 2 – Образование каллусной ткани в культуре *in vitro*

Микроклональное размножение растений основано на способности цитокининов снимать апикальное доминирование и вызывать адвентивное побегообразование. Правильный выбор соотношения цитокининов и ауксинов в питательной среде позволяет значительно увеличить коэффициент размножения и при этом сохранить генетические особенности и хозяйственно-ценные признаки исходного генотипа.

Подбор фитогормонов и их концентраций для размножения растений груши в культуре *in*

vitro проводили на основе питательной среды МС, содержащей различное количество БАП, ИМК и ГК.

На размножение груши на среде оказывают влияние генотип и гормональный состав сред. Лучшая способность к размножению наблюдалась у сортов Талгарская Красавица и Нагима, где коэффициент размножения на среде МС с БАП-0,6 мг/л; ИМК-0,1 мг/л и ГК-0,2 мг/л в среднем за 1 пассаж составил от 8 до 9 (рисунок 4).

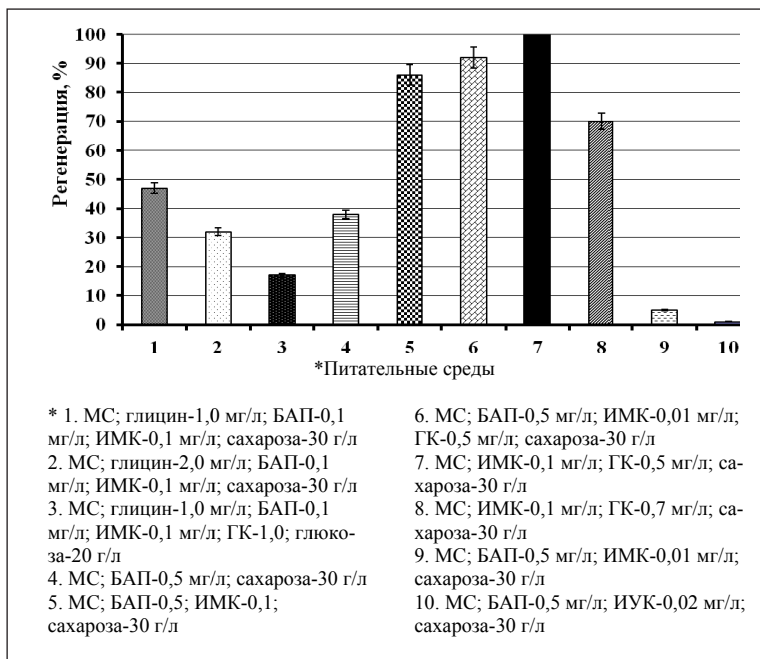


Рисунок 3 – Влияние состава питательных сред на введение груши в культуру in vitro

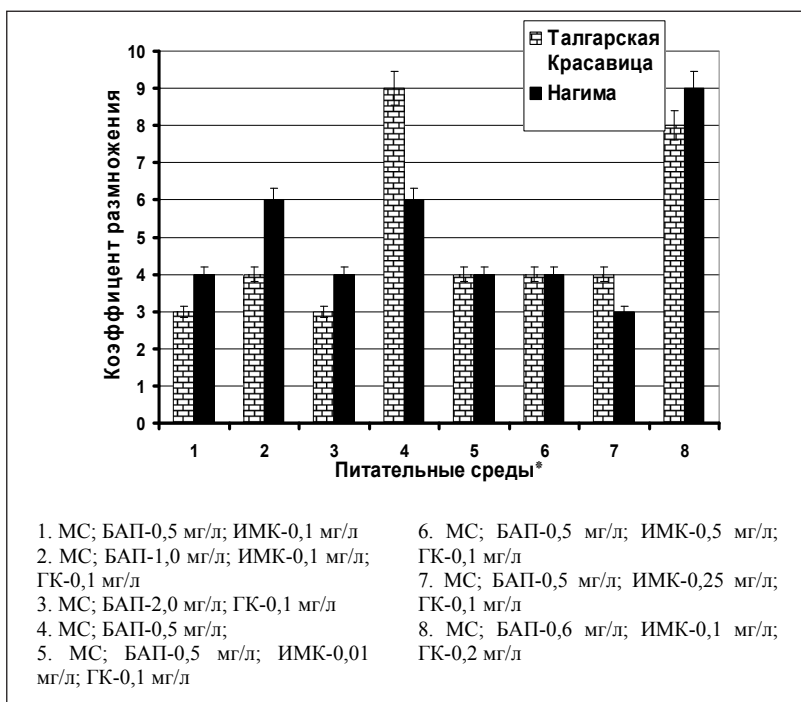


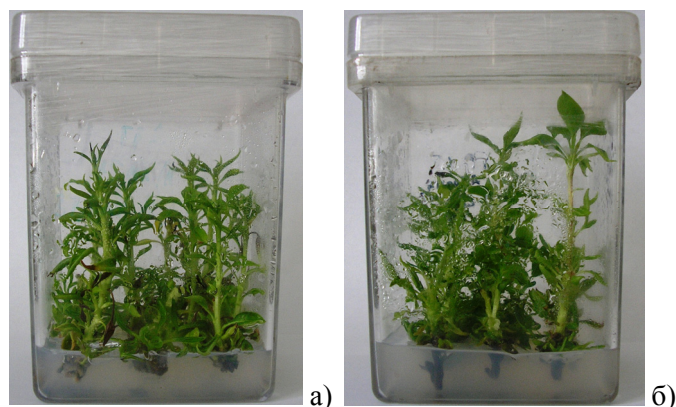
Рисунок 4 – Влияние гормонального состава питательных сред МС для клонирования груши в культуре in vitro

Наблюдения показали, что увеличение в среде БАП до 2,0 мг/л способствует каллусообразованию, а отсутствие в среде ГК приводит к укорачиванию побегов. На среде, содержащей только

БАП, увеличивается коэффициент размножения сорта Талгарская Красавица, а у сорта Нагима число добавочных побегов остаётся средним. Оптимальной для размножения эксплантов в куль-

туре *in vitro* является среда МС с фитогормонами: БАП-0,6 мг/л; ИМК-0,1 мг/л; ГК-0,2 мг/л (рисунок 2). В этом случае микропобеги хорошо развиты, отличаются выравненностью, одинаковой

толщиной и высотой, коэффициент размножения в среднем наибольший, а меристемы, выделяемые для криосохранения, к моменту вычленения имеют одинаковую структуру (рисунок 5).



а) сорт Талгарская Красавица, б) сорт Нагима

Рисунок 5 – Растения груши в культуре *in vitro*

Однако по литературным данным для массового размножения груши в культуре *in vitro* рекомендуется использовать концентрацию БАП – 2,0 мг/л [9], такая концентрация в наших экспериментах приводила к каллусообразованию. В проведённых этими исследователями экспериментах более низкая концентрация БАП – 1,0 мг/л приводила к удлинению побегов, а сочетание БАП и ИМК не давала хороших результатов при культивировании эксплантов. Это также не согласуется с нашими данными, так как более низкая концентрация БАП (0,6 мг/л) в наших экспериментах была оптимальной, а сочетание БАП и ИМК было лучшим и приводило к максимальному образованию адвентивных побегов. Рекомендуемая Reed В.М. концентра-

ция БАП для клонирования груши в культуре *in vitro* – 1,0 мг/л [4]. Сопоставление приведённых литературных данных и полученных нами в ходе экспериментов свидетельствует о сортовой специфичности растений груши в потребности в фитогормонах при клональном микроразмножении.

В результате на основе проведённых исследований были введены в культуру *in vitro* и размножены 23 сорта груши (*P. communis* L.) и 2 дикорастущие формы *P. pyraeaster* L. и *P. regelii* Rehd. Оптимизирован режим стерилизации исходных эксплантов груши от сапрофитной микрофлоры, выявлены оптимальные соотношения и концентрации фитогормонов для введения в культуру *in vitro* и микрклонального размножения.

Литература

- 1 Митрофанова О.В., Славгородская-Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта: Крымпресс, 2000. – 45 с.
- 2 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.
- 3 Расторгуев С.Л. Совершенствование селекционного процесса плодовых и ягодных растений на основе цитологических методов и культуры изолированных тканей: дис. ... док. с/х. наук: 06.01.05. – Мичуринск РФ: Наукоград, 2008.
- 4 Reed В.М., Wada S., DeNoma J., Niedz R.P. Improving *in vitro* mineral nutrition for diverse pear germplasm // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2013. – V. 49. – С. 343-355.
- 5 Расторгуев С.Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений. – изд-во МичГАУ. – Мичуринск, 2009. – 170 с.

- 6 Зленко В.А., Трошин Л.П., Котиков И.В. Размножение оздоровленного посадочного материала винограда в культуре *in vitro* // Садоводство и виноградарство. – 2005. – № 1. – С. 21-23.
- 7 Калинин Ф.А., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроразмножения растений. – Киев, 1992. – 228 с.
- 8 Viss P.R., Brooks E.M., Driver J.A. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – 1991. – V. 27. – P. 42.
- 9 Ташматова Л.В. Клональное микроразмножение и депонирование перспективных форм груши: автореф. ... канд. с-х. наук: 06.01.01. – Орел, 2012. – 25 с.

References

- 1 Mitrofanova O.V., Slavgorodskaja-Kurpieva L.E., Mitrofanova I.V., Lukicheva L.A. Diagnostika virusnyh boleznej i biotehnologicheskie priemy polucheniya bezvirusnogo posadochnogo materiala kostochkovykh plo-dovyh kul'tur. – Jalta: Krympress, 2000. – 45 s.
- 2 Lesnikova N.P., Susskij A.N., Gorina V.M. Mikrorazmnozhenie *in vitro* alychi (*Rrunus serasifera* Ehrh.) kak vozmozhnost' uskoreniya selekcionno-go processa // *Bjul. nikit. botan. sada.* – 2002. – Vyp. 86. – S. 57-60.
- 3 Rastorguev S.L. Sovershenstvovanie selekcionnogo processa plodovyh i jagodnyh rastenij na osnove citologicheskikh metodov i kul'tury izoliro-vannyh tkanej: dis. ... dok. s/h. nauk: 06.01.05. – Michurinsk RF: Naukograd, 2008.
- 4 Reed B.M., Wada S., DeNoma J., Niedz R.P. Improving *in vitro* mineral nutrition for diverse pear germplasm // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2013. – V. 49. – S. 343-355.
- 5 Rastorguev S.L. Kul'tura izolirovannyh tkanej i organov v selekcii plodovyh rastenij. – izd-vo MichGAU. – Michurinsk, 2009. – 170 s.
- 6 Zlenko V.A., Troshin L.P., Kotikov I.V. Razmnozhenie ozdorovlennogo posadochnogo materiala vinograda v kul'ture *in vitro* // *Sadovodstvo i vinog-radarstvo.* – 2005. – № 1. – S. 21-23.
- 7 Kalinin F.A., Kushnir G.P., Sarnackaja V.V. Tehnologija mikroklo-nal'nogo razmnozhenija rastenij. – Kiev, 1992. – 228 s.
- 8 Viss P.R., Brooks E.M., Driver J.A. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – 1991. – V. 27. – P. 42.
- 9 Tashmatova L.V. Klonal'noe mikrorazmnozhenie i deponirovanie perspektivnyh form grushi: avtoref. ... kand. s-h. nauk: 06.01.01. – Orel, 2012. – 25 s.