

Глава 4.

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 634.711:631.532:581.143.6

doi: 10.31360/2225-3068-2020-73-112-119

**РАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO*
РЕМОНТАНТНЫХ СОРТОВ И ГИБРИДА МАЛИНЫ**

Гашенко О. А., Кухарчик Н. В., Фролова Л. В.

*Республиканское научно-производственное
дочернее унитарное предприятие «Институт плодородства»,
аг. Самохваловичи, Республика Беларусь, e-mail: GashenkoOlga@yandex.by*

Исследования проведены в отделе биотехнологии РУП «Институт плодородства» в 2019 г. Объектами исследований являлись 3 образца малины ремонтантной (сорта ‘Геракл’ и ‘Херитидж’, отечественный гибрид 02-03-10). Оценена эффективность введения в культуру *in vitro* сортов и гибрида ремонтантной малины. Эффективность введения эксплантов *in vitro* составила от 72 до 92,6 %. Для сорта ‘Херитидж’ и гибридной формы 02-03-10 лучшие результаты введения в культуру *in vitro* отмечены во второй декаде ноября и во второй декаде января (количество инфицированных эксплантов не превышало 5 %, некротировавших – 14,6 %). Для сорта ‘Геракл’ приемлемыми оказались все изученные сроки введения в культуру *in vitro*. Установлены параметры микроразмножения сортов и гибрида малины *in vitro*. На этапе микроразмножения на питательной среде с добавлением 0,8 мг/л 6-БА максимальные коэффициенты размножения отмечены для сорта ‘Геракл’ – до 3,57, далее гибридной формы 02-03-10 – до 1,73 и сорта ‘Херитидж’ – до 1,13. Число субкультивирований не оказало достоверного влияния ($p > 0,5$) на длину микропобегов сортов и гибридной формы ремонтантной малины.

Ключевые слова: малина, культура *in vitro*, микроразмножение, эксплант, *Rubus L.*, Беларусь.

Малина является одной из наиболее популярных культур, широко распространена в промышленных садах и на приусадебных участках. В последнее время возрос интерес к ремонтантным сортам малины, которые способны, в отличие от обычных растений малины, плодоносить на однолетних побегах. Лучшие из современных сортов ремонтантного типа обладают высокой урожайностью, крупноплодностью, экологической адаптивностью, пригодны к низкзатратным технологиям возделывания [8, 11, 13].

Однако ремонтантные сорта малины, полученные с использованием межвидовой и внутривидовой гибридизации, имеют низкие коэффициенты размножения в полевых условиях из-за крайне слабого побегообразования [4–7, 9, 11]. Данная биологическая особенность ремонтантной малины

увеличивает период полевого размножения и, следовательно, значительно удлиняет процесс перехода элитных форм к сортоиспытанию [6].

В настоящее время для размножения и сохранения новых форм и сортов растений широко используют биотехнологические приемы, применение которых оправдано и экономически эффективно, особенно в отношении ягодных культур [2, 6, 8–11, 15, 16]. Перспективность использования этого метода обусловлена возможностью работать в контролируемых условиях в течение всего года и получать необходимое количество посадочного материала к определенному сроку, что особенно актуально при размножении нового селекционного материала, тем самым, сокращая сроки между получением новых форм (сортов) и их реализацией [1, 2, 4–6, 9, 14–17].

Существует ряд проблематичных моментов на отдельных этапах клонального микроразмножения: повышение процента приживаемости эксплантов при введении в культуру *in vitro* и увеличение коэффициента размножения на начальных этапах, что создаёт предпосылки для дальнейшего изучения и оптимизации данных этапов [1, 11, 12, 14]. Малина при размножении *in vitro* имеет сортовые особенности, которые проявляются в различной способности меристем разных сортов к размножению [13].

Регенерационная способность апексов малины в значительной мере связана с сезонностью. Оптимальным временем для вычленения является период активного роста. Для введения в культуру *in vitro* используют меристематические верхушки размером 0,25–0,75 мм с последующим культивированием их на питательных средах [9, 12, 13, 16].

Целью данного исследования было определение оптимальных сроков введения в культуру *in vitro* и установление параметров микроразмножения селекционного гибрида и сортов ремонтантной малины.

Методика исследований. Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2019 г. Объектами исследований являлись 3 образца малины ремонтантной (сорта ‘Геракл’ и ‘Херитидж’, гибрид 02-03-10).

‘Геракл’ – ремонтантный сорт, выведен на Кокинском опорном пункте ВСТИСП Казаковым И. В. Сорт среднераннего срока созревания. Куст среднерослый, компактный. Побеги прочные, пряморослые, шиповатые. Ягоды крупные (средняя масса 3,6 г), усечённо-конической формы, плотные, рубиновые. Потенциал урожайности достигает 15 т/га, до наступления осенних заморозков в центральной зоне плодоводства успевает созреть до 95 % урожая. Назначение универсальное.

‘Херитидж’ – ремонтантный сорт американской селекции. Сорт среднепозднего срока созревания. Куст среднерослый, полураскидистый.

Побегообразовательная способность средняя. Побеги шиповатые. Плоды средnekрупные (средняя масса 3,1 г), усечено-конические, светло-красные, плотные. В центральной зоне плодoводства Республики Беларусь потенциал урожайности до наступления осенних заморозков реализуется на 60–75 %, фактическая урожайность – 5 т/га. Назначение сорта универсальное.

Гибрид 02-03-10 (6-20 × Polka) – белорусский гибрид малины ремонтантного типа раннего срока созревания. Куст среднерослый, компактный. Побегообразовательная способность высокая. Побеги среднешиповатые. Ягоды крупные (средняя масса 4,1 г), плотные, конической формы, красные с блеском. Обладает продуктивностью до 18 т/га, в центральной зоне плодoводства Республики Беларусь потенциал продуктивности реализует на 95–100 %. Назначение универсальное.

Условия культивирования растений *in vitro* освещение 2,5–3,0 тыс. люкс, температура +21...+23 °С, фотопериод 16/8 часов. Длительность субкультивирования 4 недели. Повторность опыта трёхкратная, количество эксплантов на повторность – 10.

Эксплантами служили пазушные почки однолетних побегов малины. С почек в стерильных условиях удаляли 2–3 пары верхних зачаточных листьев, оставляя конус роста, включающий меристематическую ткань, с несколькими примордиальными листочками.

Введение в культуру *in vitro* проводили в период покоя в следующие сроки:

- 1 – 2-я декада ноября;
- 2 – 2-я декада января;
- 3 – 2-я декада марта.

Стерилизацию растительного материала проводили по общепринятым в биотехнологии схемам. Меристематические верхушки вычленили под бинокулярным микроскопом Olympus-SZ61.

Для культивирования эксплантов на этапах введения и микро размножения использовали питательную среду Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением биологически активных веществ [18], сахарозы – 30 г/л, агар-агара – 4,0 г/л, (рН – 5,6–5,7). Стерилизацию сред проводили при давлении 1 атм. в течение 15 минут.

Морфологическое развитие растений-регенерантов оценивали по следующим показателям: на этапе введения – доля инфицированных (%), некротировавших (%), жизнеспособных эксплантов (%); на этапе микро размножения – коэффициент размножения, средняя длина побегов (см).

Опыты проводили в 3-кратной повторности. Статистическую обработку проводили в программе Statistica 10, используя ANOVA, однофакторный дисперсионный анализ, критерий Дункана ($p < 0,05$)

для сравнения средних значений ($n = 3$). Построение графиков проводили в программе *Microsoft Excel*.

Результаты исследований и их обсуждение. При введении в культуру *in vitro* меристематические апексы контрольных сортов и гибридной формы малины в целом характеризовались высокой регенерационной способностью: доля жизнеспособных эксплантов (эффективность введения эксплантов) составила от 72 до 92,6 %, за исключением 3-го срока введения (2-я декада марта) для сорта ‘Херитидж’ (51,2 %) и гибридной формы 02-03-10 (55 %) (рис. 1).

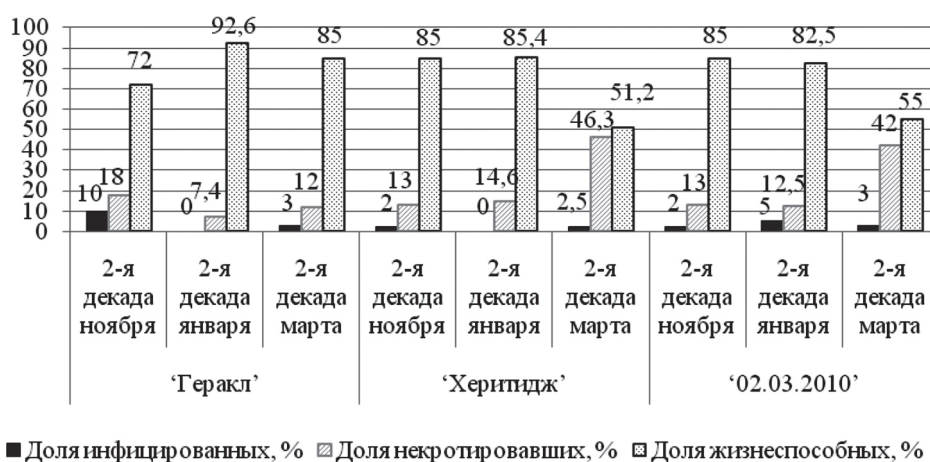


Рис. 1. Эффективность сроков введения в культуру *in vitro* сортов и гибрида ремонтантной малины

Максимальным количеством жизнеспособных эксплантов (92,6 и 85,4 %) при минимальном количестве некротировавших (7,4 и 14,6 %) и полном отсутствии инфицированных эксплантов (0 %) характеризовались контрольные сорта ‘Геракл’ и ‘Херитидж’ соответственно (срок введения 2-я декада января). Следует отметить, что для сорта ‘Геракл’ приемлемыми оказались все три срока введения в культуру.

Одинаковое количество жизнеспособных эксплантов при введении в культуру *in vitro*, как во 2-ю декаду ноября, так и во 2-ю декаду января было для контрольного сорта ‘Херитидж’ (85 и 85,4 %) и для белорусского гибрида 02-03-10 (85 и 82,5 % соответственно). В данные сроки введения экспланты характеризовались наименьшим количеством инфицированных (от 0 до 5 %). 3-й срок введения в культуру *in vitro* (2-я декада марта) оказался наименее пригодным, так как выход жизнеспособных эксплантов составил 51,2 % для сорта ‘Херитидж’, 55 % – для

гибрида 02-03-10, при большом количестве некротировавших эксплантов 46,3 % и 42 % соответственно.

На этапе микроразмножения число субкультивирований оказало достоверное влияние ($p < 0,05$) на коэффициент размножения контрольного сорта ‘Геракл’ и гибридной формы 02-03-10, и не оказало влияния ($p > 0,5$) для контрольного сорта ‘Херитидж’.

Хорошее качество микрочеренков и высокий коэффициент размножения отмечены у сорта ‘Геракл’. Данный показатель колебался от $1,9 \pm 0,32$ до $3,57 \pm 0,27$, что было достоверно выше по сравнению с сортом ‘Херитидж’ и гибридной формой малины 02-03-10 (рис. 2).

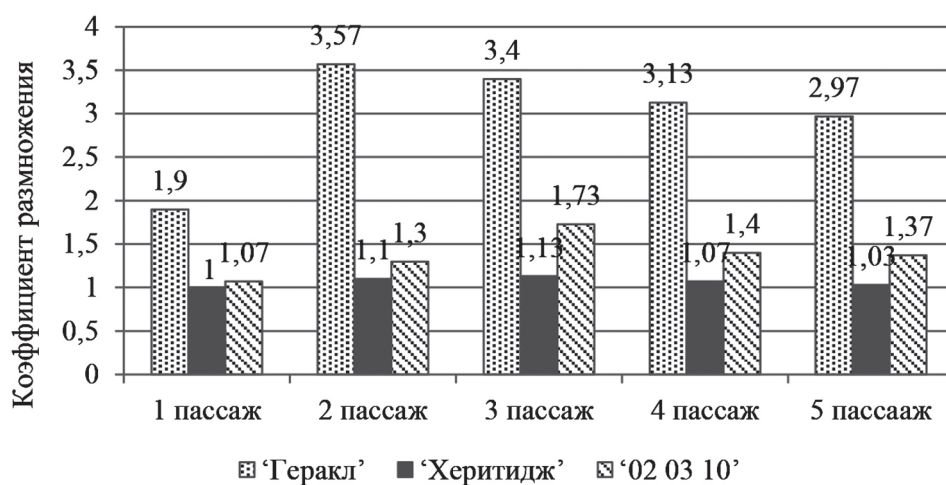


Рис. 2. Зависимость коэффициента размножения растений-регенерантов малины ремонтантной в культуре *in vitro* от числа пассажей

Коэффициент размножения сорта ‘Херитидж’ достоверно не отличался в течение всего этапа микроразмножения (от $1,0 \pm 0$ до $1,13 \pm 0,13$). Однако для гибридной формы малины 02-03-10, по сравнению с контрольным сортом ‘Херитидж’, при дальнейшем культивировании наблюдается увеличение коэффициента размножения до $1,73 \pm 0,09$ и $1,37 \pm 0,07$ – третий и пятый пассажи (рис. 2).

На протяжении всего этапа микроразмножения число субкультивирований не оказало достоверного влияния ($p > 0,5$) на длину микропобегов контрольных сортов и гибридной формы ремонтантной малины. Данные значения колебались от $1,00 \pm 0,06$ см до $1,23 \pm 0,09$ см – для сорта ‘Геракл’, от $0,70 \pm 0,06$ см до $0,90 \pm 0,06$ см – для сорта ‘Херитидж’, от $0,80 \pm 0,06$ см до $1,00 \pm 0,06$ см – для гибридной формы 02-03-10. Данные показатели статистически значимо не отличались друг от друга между сортами (рис. 3).

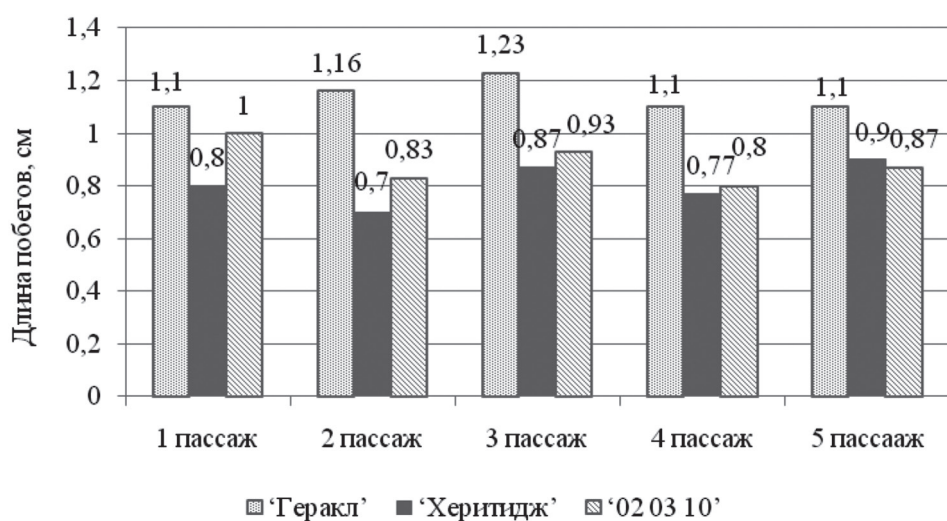


Рис. 3. Зависимость длины побегов растений-регенерантов малины ремонтантной в культуре *in vitro* от числа пассажей

Заключение. Оценена эффективность различных сроков введения в культуру *in vitro* сортов и гибрида ремонтантной малины. Эффективность введения эксплантов составила от 72 до 92,6 %. Для сорта 'Херитидж' и гибридной формы 02-03-10 введение в культуру *in vitro* во 2-ю декаду ноября и во 2-ю декаду января характеризовалось наименьшим количеством инфицированных (от 0 до 5 %) и некротировавших (от 12,5 до 14,6 %) эксплантов. Введение в культуру *in vitro* во второй декаде марта оказалось наименее эффективным – выход жизнеспособных эксплантов составил 51,2 % для сорта 'Херитидж', 55 % – для гибрида 02-03-10, при большом количестве некротировавших эксплантов (46,3 % и 42 % соответственно). Для сорта 'Геракл' приемлемыми оказались все изученные сроки введения в культуру.

Установлены параметры микроразмножения сортов и гибрида малины *in vitro*. На этапе микроразмножения коэффициент размножения составил от $1,9 \pm 0,32$ до $3,57 \pm 0,27$ для сорта 'Геракл', от $1,0 \pm 0$ до $1,13 \pm 0,13$ для сорта 'Херитидж', от $1,06 \pm 0,07$ до $1,73 \pm 0,09$ для гибридной формы 02-03-10. Число субкультивирований не оказало достоверного влияния ($p > 0,5$) на длину микропобегов контрольных сортов и гибридной формы ремонтантной малины.

Библиографический список

1. Бьядовский И.А. Регенерация и развитие эксплантов различных сортов растений малины (*Rubus idaeus* L.) на начальных этапах клонального микроразмножения в зависимости от регуляторов роста // Плодоводство и ягодоводство России. – 2015. – Т. XXXXI. – С. 59-63. – ISSN 2073-4948.
2. Иванова-Ханина Л.В. Получение посадочного материала *Rubus idaeus* L. методом микрклонального размножения *in vitro* // Известия сельскохозяйственной Тавриды. – 2018. – № 13(176). – С. 36-45. – ISSN 2413-1946.
3. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений // под ред. В.П. Лобова. – Киев: Ин-т физиологии растений и генетики, 1992. – С. 149-150.
4. Корнацкий С.А. Особенности укоренения *in vitro* микрочеренков ремонтантной малины // Плодоводство и ягодоводство России. – 2017. – Т. XXXXVIII. – С. 136-139. – ISSN 2073-4948.
5. Корнацкий С.А., Попкова А.А., Семенов А.Ж. Новая стратегия в микроразмножении ремонтантной малины // Селекция и сорторазведение садовых культур. – 2018. – Т. 5. – № 1. – С. 50-52. – ISSN 2500-0454.
6. Кульханова Д.С., Плаксина Т.В., Бородулина И.Д. Размножение *in vitro* ремонтантных сортов малины // Известия АлтГУ. – 2012. – № 3-2(75). – С. 42-45. – ISSN 1561-9443.
7. Легкая Л.В., Волосевич Н.Н. Эффективность способов размножения сортов малины ремонтантного типа // Плодоводство: сб. науч. тр. – Самохваловичи: Ин-т плодоводства нац. акад. наук Беларуси, 2009. – Т. 21. – С. 293-299. – ISSN 0134-9759.
8. Макаров С.С., Кузнецова И.Б., Дрозд В.М. Влияние регуляторов роста на органогенез малины при клональном микроразмножении // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2018. – № 3(71). – С. 111-112. – ISSN 2073-0853.
9. Малаева Е.В., Молканова О.И. Биотехнологические и экономические аспекты клонального микроразмножения ремонтантной малины // Плодоводство и ягодоводство России. – 2017. – Т. XXXXVIII. – С. 183-189. – ISSN 2073-49483.
10. Малаева Е.В., Молканова О.И., Коновалова Л.Н. Использование биотехнологических методов для ускоренного размножения ягодных культур // Плодоводство и ягодоводство России. – 2016. – Т. XXXXV. – С. 103-108. – ISSN 2073-4948.
11. Маркова М.Г., Сомова Е.Н. Повышение эффективности клонального микроразмножения ремонтантной малины // Вестник НГАУ. – 2016. – № 2(39). – С. 30-35. – ISSN 2072-6724.
12. Маркова М.Г., Сомова Е.Н. Оптимизация этапа введения в культуру ткани в клональном микроразмножении малины // Владимирский земледелец. – 2016. – № 3(77). – С. 41-43. – ISSN 2225-2584.
13. Рундя А.П., Фролова Л.В., Глушанкова Е.И. Введение и микроразмножение в культуре *in vitro* двух элитных гибридов малины белорусской селекции // Биотехнология в плодоводстве: мат-лы Междунар. науч. конф., аг. Самохваловичи, 13-17 июня 2016 г. / РУП «Ин-т плодоводства»; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи: РУП Ин-т плодоводства, 2016. – С. 78-81. – ISBN 978-985-7148-50-9.
14. Соловых Н.В. Эффективность использования различных цитокининов для клонального размножения *in vitro* растений рода *Rubus* // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – Т. XXXVII. – С. 316-321. – ISSN 2073-4948.
15. Плаксина Т.В., Ворохобова Л.С., Бородулина И.Д. Особенности клонального микроразмножения малины красной (*Rubus idaeus* L.) алтайской селекции // Садоводство и виноградарство. – 2017. – № 5. – С. 39-43. – doi: 10.18454/VSTISP.2017.5.7589.

16. Пясковская Я.А., Смолин А.М. Введение в культуру *in vitro* сортов малины // Молодёжная наука 2013: технологии, инновации: мат-лы LXXIII Всероссийской науч.-практ. конф. мол. уч., аспирантов и студентов, Пермь, 11-15 марта 2013 г. / ФГБОУ ВПО Пермская ГСХА; редкол.: Ю. Н. Зубарев [и др.]. – Пермь, ФГБОУ ВПО Пермская ГСХА, 2013. – С. 112-114. – ISBN 978-5-94279-163-6.
17. Ярмоленко Л.В. Особенности размножения сортов малины *in vitro* // Селекция и сорторазведение садовых культур. – 2017. – Т. 4. – № 1-2. – С. 161-164. – ISSN 2500-0454.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

MICROPROPAGATION OF REMONTANT RASPBERRY CULTIVARS AND HYBRID

Gashenko O. A., Kukharchik N. V., Frolova L. V.

*Republican Research
and Production Unitary Enterprise “Institute of Fruit Growing”,
Samokhvalovichy, Republic of Belarus, e-mail: GashenkoOlga@yandex.by*

The research was conducted in the Department of Biotechnology (Republican Research and Production Unitary Enterprise “Institute of Fruit Growing”) in 2019. The objects of research were 3 samples of remontant raspberry (cv. ‘Gerakl’ and cv. ‘Heritage’, domestic hybrid 02-03-10). The paper evaluated an effectiveness of *in vitro* initiation of raspberry cultivars and the hybrid. The effectiveness *in vitro* initiation ranged from 72 to 92.6 %. For cv. ‘Heritage’ and hybrid 02-03-10, the best results of *in vitro* culture initiation were observed in the second ten-day festival of November and in the second ten-day festival of January (the number of infected explants did not exceed 5 %, necrotic – 14.6 %). For cv. ‘Gerakl’, all studied terms of *in vitro* culture initiation were acceptable. The parameters of micropropagation of raspberry cultivars and the hybrid were established. At micropropagation stage (medium with addition of 0.8 mg/l 6-BA), best propagation rates were noted for cv. ‘Gerakl’ – up to 3.57, then for hybrid 02-03-10 – up to 1.73 and for cv. ‘Heritage’ – up to 1.13. The number of subcultures did not have a significant effect ($p > 0.5$) on the length of microplants studied.

Key words: raspberry, *in vitro* culture, micropropagation, explant, *Rubus* L., Belarus.