

УДК 634.73:631.533:581.143.6

Т. Н. БОЖИДАЙ, Н. В. КУХАРЧИК

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO* И УКОРЕНЕНИЯ *EX VITRO* ГОЛУБИКИ СОРТА NORTHBLUE

Институт плодоводства, аг. Самохваловичи, e-mail: tanya_bozhidaj@mail.ru

(Поступила в редакцию 21.11.2013)

Введение. В соответствии с «Государственной комплексной программой развития картофелеводства, овощеводства и плодоводства в 2011–2015 годах» в Институте плодоводства формируется свободная от вирусных патогенов базовая коллекция районированных сортов голубики, брусники и клюквы. Основными этапами создания ССЭ коллекции является выделение свободных от вирусов растений (методами ИФА и ПЦР), их сохранение и размножение в культуре *in vitro*, адаптация и выращивание с закрытой корневой системой.

Основываясь на разработках ведущих ученых в области микроразмножения брусничных культур, в том числе в отечественных публикациях, показано, что эффективность размножения *in vitro* в значительной степени определяется генотипом и составом питательной среды [1–6]. Укоренение микропобегов растений рода *Vaccinium* L. может проходить как в условиях *in vitro* [1, 5–7], так и *ex vitro* [1, 3, 7–9], что актуально для интенсификации технологии получения оздоровленного посадочного материала [3, 9].

Цель исследования – определение оптимальных условий для размножения *in vitro* и укоренения *ex vitro* голубики сорта Northblue.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства». Материалом для исследования служили растения-регенеранты голубики полувысокой сорта Northblue.

Сорт отобран в 1973 г. из гибридных семян, полученных в 1967 г. от семян скрещивания *V. angustifolium* Ait. × *V. corymbosum* L. Ветвистый куст высотой 0,6–1,0 м. Плоды начинают созревать в середине июля. Урожайность 1–5 кг/раст. Ягоды крупные, сладко-кислые, масса 100 шт. – 260 г. Сорт считается одним из наиболее морозостойких, рекомендуется для выращивания в регионах, где продуктивность высокорослых сортов снижается из-за неблагоприятных условий зимнего периода [2]. Сорт включен в Государственный реестр сортов, допущенных к использованию на территории Республики Беларусь, в 2012 г.

Для изучения влияния базовой питательной среды (минерального состава и витаминов) на развитие микропобегов растения-регенеранты культивировали на следующих питательных средах: макросоли и витамины по прописи Debnath и McRae, микросоли по прописи Мурасиге и Скуга (DM+MS) [10], Андерсона [11], Woody Plant Medium (WPM) [12], по прописи Debnath и McRae (DM) [10, 13]. При этом в питательные среды добавляли 5 мг/л 2-изопентениладенина (2-iP).

При изучении влияния цитокининов на микроразмножение растений-регенерантов использовали зеатин и 2-iP в концентрациях 1, 2, 3 мг/л и 2, 5, 10 мг/л соответственно, которые добавляли в питательные среды, выделенные из предыдущего опыта. Стерилизацию сред проводили при давлении 0,9 атм в течение 15 мин после введения в нее всех необходимых витаминов и физиологически активных веществ. Условия культивирования: освещение 2,5–3,0 тыс. лк, температура +21...+23 °С, фотопериод 16/8 ч. Длительность одного пассажа – 4 недели. Морфологическое развитие растений-регенерантов на этапе микроразмножения оценивали по следующим показателям: коэффициент размножения, средняя длина побегов, см, максимальная длина побегов, см.

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 высаживали в мини-парники 450×200×70 мм (расстояние между рядами – 10–15 мм, в ряду – 7–10 мм). При посадке часть микропобегов погружали базальной частью в раствор индолилмасляной кислоты (ИМК) в концентрации 0,5 мг/л (экспозиция 5 мин) и 300 мг/л (1 с). Условия укоренения: освещение 2,5–3 тыс. лк, температура + 20...+ 22 °С, фотопериод 16/8 ч. Длительность культивирования – 4 недели. Анализируемые показатели: доля укоренившихся побегов, %, длина побега, см, количество междоузлий, шт., максимальная длина корней, см, длина основной массы корней, см.

Статистическую обработку 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.

Результаты и их обсуждение. В результате проведения однофакторного дисперсионного анализа выявлено влияние ($p < 0,01$) базовой питательной среды на коэффициент размножения голубики сорта Northblue. Максимальный коэффициент размножения был отмечен на питательной среде WPM и DM.

Растения, культивируемые на различных средах, по средней длине побегов статистически достоверно не отличались друг от друга. По максимальной длине побегов визуально лучший результат был получен на питательной среде WPM, однако он достоверно не отличался от полученных значений на питательных средах DM+MS и DM (табл. 1).

Таким образом, для изучения влияния цитокининов на развитие микропобегов голубики сорта Northblue были использованы питательные среды WPM и DM.

Однофакторный дисперсионный анализ показал, что концентрация цитокинина оказывает значимое влияние ($p < 0,01$) на коэффициент размножения, максимальную и среднюю длину по-

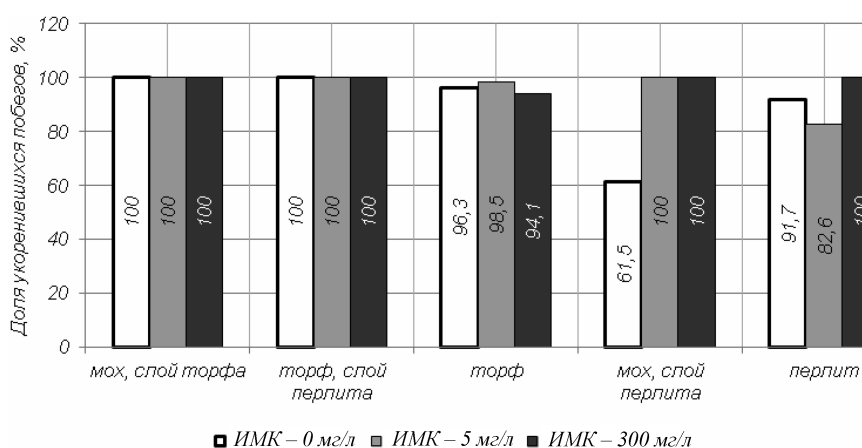
Т а б л и ц а 1. Развитие растений-регенерантов голубики сорта Northblue на разных питательных средах

Питательная среда	Коэффициент размножения	Средняя длина побегов, см	Максимальная длина побегов, см
DM+MS	2,70±0,17 ^a	1,00±0,10 ^a	1,30±0,13 ^{ab}
Андерсона	2,73±0,12 ^a	0,87±0,04 ^a	1,09±0,03 ^a
WPM	4,03±0,35 ^b	0,98±0,02 ^a	1,45±0,06 ^b
DM	3,53±0,15 ^b	1,00±0,06 ^a	1,31±0,04 ^{ab}

Пр и м е ч а н и е. Данные с одинаковыми буквами по столбцам статистически не различаются при $p < 0,05$. То же для табл. 2, 3.

Т а б л и ц а 2. Развитие растений-регенерантов голубики сорта Northblue в зависимости от типа и концентрации цитокинина

Питательная среда	Цитокинин	Концентрация цитокинина, мг/л	Коэффициент размножения	Средняя длина побегов, см	Максимальная длина побегов, см
WPM	2-iP	2	2,03±0,19 ^a	1,32±0,04 ^{cf}	1,59±0,14 ^{de}
		5	3,10±0,58 ^b	1,02±0,11 ^{cde}	1,34±0,06 ^{cd}
		10	2,90±0,21 ^{ab}	0,91±0,08 ^{abcd}	1,20±0,07 ^{bc}
	Зеатин	1	2,87±0,07 ^{ab}	1,16±0,07 ^{def}	1,49±0,07 ^{de}
		2	4,60±0,66 ^c	0,96±0,03 ^{bcd}	1,37±0,06 ^{cde}
		3	5,30±0,21 ^c	0,69±0,03 ^{ab}	0,96±0,07 ^{ab}
DM	2-iP	2	1,90±0,12 ^a	1,44±0,10 ^f	1,62±0,09 ^e
		5	2,70±0,17 ^{ab}	1,07±0,02 ^{cde}	1,35±0,12 ^{cde}
		10	2,63±0,18 ^{ab}	0,90±0,08 ^{abcd}	1,07±0,09 ^{ab}
	Зеатин	1	2,80±0,15 ^{ab}	1,06±0,02 ^{cde}	1,37±0,06 ^{cde}
		2	3,13±0,12 ^b	0,80±0,05 ^{abc}	1,04±0,01 ^{ab}
		3	3,40±0,40 ^b	0,61±0,05 ^a	0,84±0,08 ^a



Доля укоренившихся микропобегов голубики сорта Northblue в условиях *ex vitro*

бегов микрорастений голубики сорта Northblue. Также на коэффициент размножения значимое влияние ($p < 0,05$) оказала базовая питательная среда.

При повышении концентрации зеатина отмечается увеличение коэффициента размножения, однако при этом снижается длина микропобегов, а использование высоких концентраций 2-иР приводит к снижению и коэффициента размножения, и длины микропобегов (табл. 2).

Исходя из полученных результатов, наиболее приемлемой для размножения *in vitro* растений-регенерантов голубики сорта Northblue является питательная среда WPM с 2 мг/л зеатина. Так как зеатин является достаточно дорогостоящим цитокинином, то как альтернативный вариант может быть использована питательная среда WPM с 5 мг/л 2-иР.

В результате анализа укореняемости микропобегов голубики сорта Northblue *ex vitro* было установлено, что доля укоренившихся микропобегов на изучаемых субстратах колебалась от 61,5 до 100 % (рисунок).

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что значимое влияние на длину побега, количество междоузлий, длину корней оказали тип субстрата ($p < 0,001$), концентрация ИМК ($p < 0,05$), а также совместное действие этих двух факторов ($p < 0,01$).

По длине побега и корней растения на мхе со слоем торфа имели самые высокие показатели и достоверно отличались от растений на других субстратах. По количеству междоузлий лучшие результаты были получены на верховом торфе со слоем перлита и на мхе со слоем торфа (табл. 3).

Таблица 3. Морфометрические показатели развития растений-регенерантов голубики сорта Northblue при укоренении *ex vitro* в зависимости от типа субстрата и концентрации ИМК

Субстрат	Концентрация ИМК, мг/л	Длина побега, см	Количество междоузлий, шт.	Длина корней, см	
				максимальная	основной массы
Мох со слоем верхового торфа	0	3,86±0,21 ^g	8,93±0,53 ^{cd}	2,68±0,13 ^e	1,49±0,08 ^c
	0,5	3,59±0,24 ^{fg}	8,83±0,42 ^{cd}	2,48±0,20 ^g	1,25±0,08 ^d
	300	3,39±0,19 ^{efg}	8,38±0,32 ^{cd}	2,38±0,04 ^g	1,35±0,04 ^{de}
Верховой торф со слоем перлита	0	2,71±0,17 ^{cd}	8,22±0,38 ^{cd}	0,79±0,11 ^a	0,54±0,08 ^a
	0,5	3,25±0,20 ^{def}	9,45±0,60 ^d	1,23±0,08 ^{bcd}	0,82±0,03 ^b
	300	3,23±0,08 ^{def}	8,86±0,30 ^{cd}	1,19±0,04 ^{bc}	0,77±0,06 ^b
Верховой торф	0	3,45±0,13 ^{efg}	8,78±0,14 ^{cd}	1,56±0,17 ^{def}	0,88±0,09 ^{bc}
	0,5	3,16±0,20 ^{def}	7,77±0,32 ^{bc}	1,63±0,22 ^{ef}	0,94±0,05 ^{bc}
	300	2,53±0,16 ^{bc}	6,88±0,36 ^b	1,68±0,03 ^f	1,01±0,06 ^c
Мох со слоем перлита	0	1,72±0,28 ^a	5,26±0,81 ^a	0,70±0,07 ^a	0,45±0,04 ^a
	0,5	3,35±0,15 ^{efg}	8,73±0,24 ^{cd}	1,56±0,09 ^{def}	0,89±0,04 ^{bc}
	300	2,88±0,15 ^{cde}	7,82±0,23 ^{bc}	1,30±0,03 ^{cde}	0,94±0,07 ^{bc}
Перлит	0	1,87±0,19 ^a	5,53±0,38 ^a	0,78±0,02 ^a	0,51±0,02 ^a
	0,5	2,03±0,19 ^{ab}	5,47±0,27 ^a	0,83±0,06 ^a	0,53±0,04 ^a
	300	1,86±0,06 ^a	5,03±0,22 ^a	0,91±0,06 ^{ab}	0,60±0,02 ^a

Микропобеги, укоренившиеся на лучшем субстрате (мох *Sphagnum* L. со слоем верхового торфа) без предварительной обработки и обработанные ИМК, статистически достоверно ($p < 0,05$) не отличались друг от друга по изучаемым показателям. Следовательно, использование ИМК для стимулирования корнеобразования микропобегов голубики сорта Northblue является нерациональным.

Заключение. Установлено, что наиболее приемлемой для размножения *in vitro* растений-регенерантов голубики сорта Northblue является питательная среда WPM с 2 мг/л зеатина или 5 мг/л 2-иР, которая позволяет получать микрорастения с коэффициентом размножения $4,60 \pm 0,66$ или $3,10 \pm 0,58$ соответственно и средней длиной побегов $0,96 \pm 0,03$ см или $1,02 \pm 0,11$ см.

Укоренение микропобегов в условиях *ex vitro* на субстрате мох *Sphagnum* L. со слоем верхового торфа (0,5 см) позволяет одновременно укоренять и адаптировать регенеранты. Эффективность совмещенного укоренения и адаптации составляет 100 %, при этом растения имеют длину побега $3,86 \pm 0,21$ см, максимальную длину корней и длину основной массы корней $2,68 \pm 0,13$ см и $1,49 \pm 0,08$ см соответственно.

Литература

1. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / Науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. Мн., 2012. Т. 3. С. 347–355.
2. Титок В. В., Володько И. К., Лунина Н. М. и др. Центральный ботанический сад НАН Беларуси: сохранение, изучение и использование биоразнообразия мировой флоры / Под ред. В. В. Титка, В. Н. Решетникова. Мн., 2012. С. 153–162, 252–264.
3. Кумас Е. Н. Научные основы клонального микроразмножения растений на примере интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1997.
4. Debnath S. C. // Can. J. Plant Sci. 2007. Vol. 87, N 4. P. 911–922.
5. Ostrolucka M. G., Gajdosova A., Ondruskova E., Libiakova G. // Agronomijas Vestis. 2009. N 12. P. 75–80.
6. Ruzic D., Vujovic T., Cerovic R. et al. // Acta Hort. 2012. Vol. 926. P. 265–272.
7. Meiners J., Schwab M., Szankowski I. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2007. Vol. 89, N 2–3. P. 169–176.
8. Liu C., Callow P., Rowland L. J. et al. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2010. Vol. 103, N 1. P. 137–144.
9. Mihaljevic S., Salopek-Sondi B. // Plant Soil Environ. 2012. Vol. 58, N 5. P. 236–241.
10. Debnath S. C., McRae K. B. // Small Fruits Rev. 2001. Vol. 1, N 3. P. 3–19.
11. Anderson W. C. // Acta Hort. 1980. Vol. 112. P. 13–20.
12. Lloyd G., McCown B. // Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 1980. Vol. 30. P. 421–427.
13. Debnath S. C. // HortScience. 2005. Vol. 40, N 1. P. 185–188.

T. N. BOZHIDAY, N. V. KUKHARCHIK

PECULIARITIES OF *IN VITRO* PROPAGATION AND *EX VITRO* ROOTING OF BLUEBERRY CV. NORTHBLUE

Summary

The optimal conditions for *in vitro* propagation and *ex vitro* rooting of blueberry cv. Northblue were defined. It was found that woody plant medium (WPM) with 2 mg/l zeatin or 5 mg/l 2-isopenteniladenine is the most acceptable for *in vitro* propagation of regenerants. Rooting *in vitro*-derived shoots in *ex vitro* conditions on substrate such as moss *Sphagnum* L. with layer of peat (0,5 cm) enables to root and adapt regenerants (efficiency – 100 %).