

## ОМОЛОЖЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ И ПОЛУЧЕНИЕ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ПОЛЕНИКИ АРКТИЧЕСКОЙ (*RUBUS ARCTICUS* L.)

Андрей В. Константинов \*, Е.Н. Химченко, Д.В. Кулагин

**Аннотация.** В статье описаны последствия длительного культивирования асептической культуры поленики и описание мер по их преодолению, показаны этапы субкультивирования растений в ходе омоложения. Приведена методика акклиматизации регенерантов к почвенным условиям на субстратах различного состава.

**Ключевые слова:** *Rubus arcticus*, культивирование *in vitro*, акклиматизация, субстрат, агроперлит, «Триона»

Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, Гомель, 247000, Беларусь; \* avkonstantinof@mail.ru

### Введение

Поленика, княженика или мамура (*Rubus arcticus* L.) – это травянистое многолетнее растение высотой до 35 см, с длинным и тонким ползучим корневищем. Стебель простой, прямостоячий, тупотрёхгранный, без шипов, с чешуйками при основании. Листья тройчатые, тонкие, морщинистые, опушенные, на длинных опушенных черенках, с прилистниками. Цветки верхушечные, одиночные, розового или розово-красного цвета. Плоды – сборные костянки, очень сладкие. Цветёт в июне, ягоды созревают в июле-августе. Плоды содержат до 7% сахара, около 2% лимонной кислоты, витамин С. Растение неприхотливо, урожайность может достигать 500 кг с 1 га, что делает культуру перспективной для промышленного выращивания. (Кощев 1992).

Получение посадочного материала высокого качества возможно с применением технологии клонального микроразмножения, позволяющей решить ряд практических задач, стоящих перед сельским хозяйством. В настоящее время метод культивирования *in vitro* клеток и регенерация из них растений разработан для многих видов (GEORGE & SHERRINGTON 1984).

Но существует ряд причин, затрудняющих эффективное применение технологий микроразмножения. Проблема клонового старения вегетативно размножаемых растений является одной из фундаментальных общебиологических проблем. Изучение возрастных изменений ряда культур, происходящих при длительном клонировании *in vitro* показало, что происходит не только омоложение, но и накопление возрастных

изменений, которые приводят к переходу ювенильных побегов в зрелое возрастное состояние и затем к старению и гибели клона. При длительном выращивании *in vitro*, хорошо развивается надземная часть и корневая система, однако теряется способность к росту при автотрофном питании. В почвенных условиях происходит ингибирование развития корневой системы, снижение способности растений продуцировать цитокинины при выращивании их как *in vitro*, так и в почве. Вероятно, данное изменение является одной из причин неспособности растений адаптироваться к условиям почвенной среды (КАТАЕВА и др. 1990; ШАРАФУТДИНОВА 2000). Онтогенетическое старение побегов при длительном культивировании указывает на необходимость обновления культур при микроразмножении, а так же на важность разработки эффективных методов акклиматизации растений к почвенным условиям, снимающим негативные последствия культивирования в условиях *in vitro*.

Целью работы являлась разработка мероприятий по омоложению асептической культуры поленики и акклиматизации регенерантов к почвенным условиям *ex vitro*.

### Материалы и методы исследований

При выращивании растений в условиях *in vitro* применялись стандартные методики культивирования. Использовались среды WPM (LLOYD & McCOWN 1980) и MS (MURASHIGE & SKOOG 1964), безгормональные, либо с добавлением регуляторов роста. Среда автоклавировали 30 мин при 1,2 атм. Растения

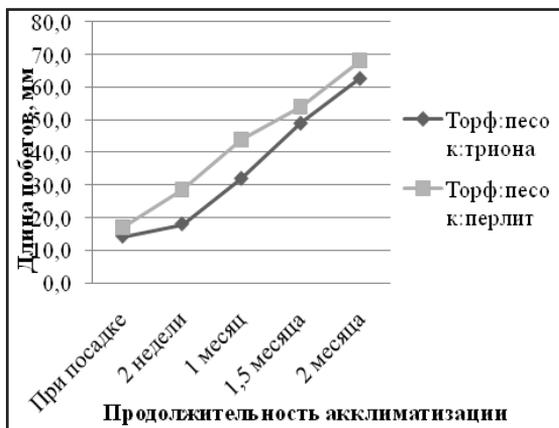


Рис. 1. Прирост растений поленики за период исследования.

Fig. 1. Growth of bramble plants for investigated period.

высаживались по 7-9 шт. в один сосуд, объёмом 200 мл.

Длительность акклиматизации растений к условиям *ex vitro* составляла 2 месяца. Первый месяц поддерживались следующие условия: температура  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , относительная влажность воздуха около 90%, освещённости 2000 лк и фотопериод 16/8 часов. Второй месяц растения содержались в условиях влажности воздуха около 50%, при той же температуре и освещённости. Для проведения эксперимента были взята почвенная смесь, включающая нераскисленный верховой торф и песок в соотношении 3:1, к которой добавляли 2 части перлита либо субстрат «Триона». Для выращивания применяли кассеты с объёмом ячейки 170 мл. Акклиматизация проводилась для 60 растений.

Развитие растений оценивали по показателю длины побега (мм) от поверхности субстрата до верхушечной почки, количеству междоузлий, листьев и дополнительных побегов на растении, учитывали приживаемость регенерантов (Рис. 1). Замеры производили непосредственно после посадки растений и далее каждые две недели до окончания периода адаптации. Анализ данных проводился с использованием средств дисперсионного анализа пакета «Statistica 6.0» и табличного редактора Microsoft Excel.

### Результаты и их обсуждение

Поленика сорта «Pima» (*Rubus arcticus* cv. «Pima») депонируется в коллекции асептических культур лаборатории генетики и биотехнологии

около десяти лет. На этапе введения поленики в асептическую культуру в качестве первичных эксплантов использовали отрезки побегов с почками, которые после стерилизации 0,1% раствором диацета и трёхкратного промывания стерильной дистиллированной водой помещали на модифицированную среду для древесных растений WPM, дополненную 6-бензиламинопурином (БАП) в различных концентрациях (Шалупаев и Яцына 2002).

Полученная перевиваемая культура поленики длительное время поддерживалась на безгормональной среде WPM с добавлением  $30 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  сахарозы в качестве источника углерода. Для предотвращения бактериальной контаминации периодически проводились пассажи на среду с добавлением антибиотика цефотаксима («Cefotaxime») в концентрации  $500 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ . Длительное культивирование привело к старению асептической культуры, которое проявилось в заметном изменении морфологии регенерантов. Основные проявления которого заключались в увеличении периода времени от пассажа до начала морфогенеза, укорачивании междоузлий, значительном снижении интенсивности роста и кущения растений (средняя длина побегов – не более 1,5 см), что снизило коэффициент мультипликации до 1-2. Укоренение отмечалось лишь у отдельных растений. Для регенерантов было характерно пожелтение побегов, указывающее на изменение пигментного состава фотосинтетического аппарата растений.

С целью омоложения асептической культуры поленики нами была проведена замена питательной среды WPM на MS. Данный выбор обусловлен тем, что состав минеральных солей названной среды наиболее оптимален для травянистых растений. В качестве экзогенных регуляторов роста цитокининовой природы применялся 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрации  $0,8 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ , в качестве ауксинов добавлялась  $\alpha$ -индолилмасляная кислота (ИМК) –  $0,4 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ , так же применяли зеатин ( $0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ). В качестве источника углерода в среды добавлялась сахароза в концентрации  $30 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  либо  $20 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ . В первом случае растения развивались без изменений, а пониженная концентрация сахарозы вызывала покраснение листовых пластинок, что свидетельствует об изменении соотношения фотосинтетических пигментов в растениях.

**Табл. 1.** Морфометрические параметры растений поленики, в зависимости от физиологического состояния культуры.

**Table 1.** Morphometric parameters of arctic bramble plants, depending from the physiological state of the culture.

Состояние <i>in vitro</i> культуры	Длина побега, мм	Количество междоузлий, шт/эксплант	Количество листьев, шт/эксплант
Стареющая	7,5 ± 2,2	2,5	4,5
Омоложенная	18,3 ± 3,1	3,3	5,5

**Табл. 2.** Морфологические параметры растений поленики после акклиматизации на различных субстратах.

**Table 2.** Morphological parameters of arctic bramble plants after acclimatization on various substrates.

Вариант опыта	Длина побега, мм	Среднее количество междоузлий, шт/побег	Среднее количество побегов, шт
Торф: песок: «Триона»	62,8 ± 20,5	7,2	3,2 ± 0,8
Торф: песок: перлит	68,2 ± 24,4	9,7	2,9 ± 1,5

Для исключения бактериальной контаминации мы продолжали применение цифотаксима, но в меньшей концентрации: 100 мг·л<sup>-1</sup>, которая позволяла элиминировать инфекцию, при этом не подавляла ростовые процессы побегов поленики полностью, и не влияла на их жизнеспособность. Проводилось чередование пассажей микрочеренков на среды с содержанием антибиотика в указанной концентрации и на среды без его добавления. Постоянное культивирование на среде с добавлением антибиотика цефотаксима приводило к ослаблению регенерантов.

На средах, содержащих регуляторы роста, растения культивировались в течение 2 недель – 1 месяца, после чего на 3 месяца переносились на безгормональные среды, либо среды, содержащие 15 мг·л<sup>-1</sup> аденина, более мягкого по степени воздействия на растения цитокинина, по сравнению с 6-БАП. Морфометрические параметры растений стареющей и омоложенной культур представлены в Таблице 1.

Применение среды MS с полным составом макросолей положительно отразилось на средней длине побегов, она составляла 18,3±3,1 мм и количестве междоузлий в пересчёте на один эксплант, их количество возросло до 3,3

штук на один побег, а листьев – до 5,5 штук на побег. Коэффициент мультипликации микрклональных растений поленики арктической повысился до 3-5. Культивирование на среде без добавления гормонов приводило к активному ризогенезу у большинства (до 100%) растений через 3-4 недели после начала формирования побегов.

Для получения качественного посадочного материала, пригодного к высадке в условия открытого грунта, необходима разработка методики акклиматизации регенерантов к почвенным условиям. В связи с тем, что растения поленики требуют рыхлую, слабокислую, хорошо дренируемую плодородную почву, применяли субстраты, различные по агрофизическим свойствам. Положительный эффект добавок заключается в пористости структуры и высокой гигроскопичности, что обуславливает их влияние на механический состав почвы. Кроме того, агроперлит препятствует слёживанию почвы, а «Триона» способствует ионному обмену (Гиль 2008; Обуховская и др. 2007).

Анализ результатов акклиматизации показал, что средняя длина побегов поленики арктической в варианте опыта с применением перлита равна 68,2±24,4 мм, а значение изучаемого показателя для варианта с добавкой «Триона» – 62,8±20,5 мм, однако превышение статистически не достоверно. Среднее количество междоузлий на побег для вариантов с добавками «Триона» и агроперлит было 7,2 шт/побег и 9,7 шт/побег соответственно и отличалось достоверно и значимо ( $F_{кр.} 9,7 < F_{ст.} 4,0$  при  $p < 0,05$ ). Среднее количество дополнительных побегов после 2 месяцев роста в условиях *ex vitro* достоверно не отличалось. Приживаемость регенерантов поленики арктической была высокой в обоих вариантах и составляла 95%. Морфологические параметры регенерантов поленики после периода акклиматизации к почвенным условиям представлены в Таблице 2.

Для изучения прохождения растениями процесса акклиматизации нами изучался прирост регенерантов в динамике. Прирост растений в вариантах опыта оказался не равномерным по периодам. В течение первого месяца растения, высаженные в почву с добавлением ионообменного субстрата «Триона» дали несколько более низкий прирост, чем растения, выращиваемые на торфо-песчаной смеси с добавлением агроперлита. Необходимо

отметить, что последние, в свою очередь, проявляли практический линейный характер роста, что говорит об их быстром приспособлении к условиям *ex vitro*, то есть благоприятном влиянии на растения поленики почвенного субстрата на основе торфа, песка и агроперлита. К концу периода адаптации интенсивность роста растений в опытных группах отличалась незначительно.

### Выводы

В результате работы, можно заключить, что культивирование в течение продолжительного времени на безгормональных средах в присутствии антибиотиков отрицательно влияет на морфологические и физиологические характеристики микрклональных растений. Преодоление данных последствий возможно с применением сред с добавлением регуляторов роста цитокининовой и ауксиновой природы.

Установлено, что в ходе акклиматизации растения поленики на почвенных смесях с исследованными добавками агроперлитом и субстратом «Триона», не проявляют существенных отличий по росту и развитию, в связи с чем предпочтительнее применять агроперлит, ввиду его доступности и относительно небольшой стоимости.

### Цитируемые источники

- КАТАЕВА Н.В., ПОПОВИЧ Е.А., КОРНЕЕВА Т.В. 1990. Влияние экзогенных регуляторов роста на старение и омоложение побегов *Hedera helix* L. *in vitro*. *Физиология растений* 37 (5): 964–972.
- КОЩЕЕВ А.К. 1992. Лесные ягоды: Справочник. Экология, Москва.
- ШАРАФУТДИНОВА Г.Г. 2000. Влияние длительности вегетативного размножения высших растений на их генетическую стабильность, на примере *Solanum tuberosum* L. Автореф. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. Уфа.
- ШАЛУПАЕВ М.П. и ЯЦЫНА А.А. 2002. Клональное микроразмножение поленики (*Rubus arcticus* L.). *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук* 3: 112–114.
- ГИЛЬ Л.С. 2008. Проблемы оптимизации воздушного режима тепличных субстратов. *Гавриш* 5: 10–12.
- ОБУХОВСКАЯ Л.В., МАКАРОВА Т.Б., ЯНЧЕВСКАЯ Т.Г. 2007. Адаптация микрклональных растений рода *Betula* к условиям выращивания *in vivo* на оптимизированном ионообменном субстрате. *Рациональное использование и воспроизводство лесных ресурсов в системе устойчивого развития (Матер. между. науч.-практ. конф.)*: 286–289.
- GEORGE E.F. & SHERRINGTON P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics.Ltd., London.
- LLOYD, G. & McCOWN B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Proc. Inter. Plant Prop.* 30: 421–427.
- MURASHIGE T. & SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 (3): 473–497.

### REJUVENATION OF THE ASEPTIC CULTURE AND OBTAINING OF PLANTING STOCK OF ARCTIC BRAMBLE (*RUBUS ARCTICUS* L.)

ANDREY V. KONSTANTINOV \*, E.N. KHMICHENKO, D.V. KULAGIN

**Abstract.** This paper describes the effects of long-term cultivation of aseptically cultured arctic bramble and measures to overcome them. It has shown the sequence stages of subculturing for shoot culture rejuvenation in the paper. A method for acclimatization of arctic bramble regenerants to soil conditions on substrates of different composition was designed.

**Key words:** *Rubus arcticus*, *in vitro* cultivation, acclimatization, substrate, agroperlite, «Triona»

Forest Research Institute, NAS of Belarus, Proletarian Str., 71, Gomel, 246001, Belarus; \* avkonstantinof@mail.ru