

УДК 57.085.2 :634.71

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ КОЛЕКЦІЇ *IN VITRO* СОРТІВ МАЛИНИ В НУБІП УКРАЇНИ

А.Ф. Ліханов, кандидат біологічних наук,
О.Ю. Чорнобров, А.А. Клюваденко, кандидати
сільськогосподарських наук,
М.Д. Мельничук, доктор біологічних наук

*Установлено умови одержання асептичних життєздатних експлантатів восьми сортів малини. Розроблено біотехнологію мікроклонального розмноження, яка включає добір компонентів живильних середовищ для різних етапів і типів морфогенезу та дає змогу одержувати значну кількість рослин-регенерантів. Створено колекцію цінних сортів малини *in vitro* різного цільового використання в НУБіП України.*

Ключові слова: *культура *in vitro*, експлантати, живильне середовище, мікроклональне розмноження, рослини-регенеранти малини, колекція сортів малини *in vitro**

Селекція ягідних культур передбачає наявність колекції рослин *in vitro*, які в сукупності являють широкий спектр різноманітних комбінацій цінних ознак вихідних форм. Українським селекціонером П. З. Шеренговим із співробітниками кафедри садівництва НУБіП України створено штабові гібридні форми та сорти малини з високою продуктивністю та стійкістю проти хвороб і шкідників [6]. Серед них вирізняються за смаковими і технологічними властивостями плодів сорти Осіння, Галинка, Благородна, Відбірна, Промінь, Сяйво [6]. Окрім цих сортів значну зацікавленість являють Примара та Херітейдж (іноземна селекція).

Хоча технологія прискороного розмноження для багатьох ягідних культур розроблена достатньо добре, відомості стосовно технології

мікроклонального розмноження малини (*Rubus idaeus* L.) неповні. Одні автори використовують пагони високопродуктивних рослин без ознак захворювання в період активного росту, інші вводять у культуру *in vitro* бруньки етіюльованих підземних пагонів [2, 4, 5]. Ураховуючи видову і сортову специфічність рослин, цей метод потребує ретельного підбору умов стерилізації і культивування, удосконалення окремих етапів біотехнологічного процесу, особливо коли це стосується конкретних генотипів [8].

Саме тому метою дослідження було розроблення біотехнології мікроклонального розмноження сортів малини Осіння, Галинка, Благородна, Відбірна, Промінь, Сяйво, Херітейдж і Примара для створення колекції культур *in vitro* різного цільового використання.

Матеріали і методи дослідження. У дослідженнях використано пагони завдовжки 15–20 см, які ізольовували з дво-трирічних рослин малини у березні. Експлантати були фрагментами мікропагонів завдовжки 10–15 мм. Стерилізацію рослинного матеріалу проводили 70 %-ним етиловим спиртом (1 хв), 2,5 %-ним NaClO (10–30 хв), 1 %-ним AgNO₃ (10–30 хв), 0,1 %-вим HgCl₂ (5–15 хв), 25 %-ним H₂O₂ (10–30 хв). Асептичні умови створювали за методами, загальноприйнятими у біотехнології [1, 3]. Експлантати малини вводили в культуру *in vitro* на живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [7]. Регенераційну здатність мікропагонів *in vitro* досліджували на МС з додаванням регуляторів росту ауксинового (0,1–2,0 мг·л⁻¹ ІМК, 0,1–1,0 мг·л⁻¹ НОК, 0,1–1,0 мг·л⁻¹ ІОК) та цитокінінового (0,1–2,0 мг·л⁻¹ БАП, 0,1–2,0 мг·л⁻¹ кінетину) типів дії. До живильних середовищ вносили 50–100 мг·л⁻¹ мезоінозитулу, 15 г·л⁻¹ глюкози чи 30 г·л⁻¹ сахарози та 6,6–6,8 г·л⁻¹ агару. Показник кислотності середовища (рН) доводили до рівня 5,7–5,9. Рослинний матеріал культивували у світловій кімнаті за температури 25 ± 1⁰ С і освітлення 2,0–3,0 клк з 16-годинним фотоперіодом та відносною вологістю повітря 70–75 %.

Статистичне опрацювання експериментальних даних виконували з використанням пакету аналізу MS Excel.

Результати дослідження. Важливою умовою отримання асептичних життєздатних культур сортів малини є правильний добір ефективних способів стерилізації рослинного матеріалу. Для цього нами використано широкий спектр стерилізуючих речовин з різними експозиціями обробки експлантатів (табл. 1).

1. Ефективність стерилізації експлантатів сортів малини (Осілля, Галинка, Благородна, Відбірна, Промінь, Сяйво, Херітейдж і Примара)

Варіант	Стерилізуюча речовина	Концентрація, %	Експозиція, хв	Кількість введених у культуру <i>in vitro</i> експлантатів, шт.	Ефективність стерилізації, %
1	NaClO	2,5	10	30	81 ± 5
2	NaClO	2,5	20	-//-	50 ± 7
3	NaClO	2,5	30	-//-	27 ± 5
4	AgNO ₃	1,0	10	-//-	77 ± 5
5	AgNO ₃	1,0	20	-//-	50 ± 7
6	AgNO ₃	1,0	30	-//-	36 ± 5
7	HgCl ₂	0,1	5	-//-	63 ± 5
8	HgCl ₂	0,1	10	-//-	92 ± 3
9	HgCl ₂	0,1	15	-//-	69 ± 7
10	H ₂ O ₂	25	10	-//-	45 ± 4
11	H ₂ O ₂	25	20	-//-	74 ± 5
12	H ₂ O ₂	25	30	-//-	41 ± 6

За нашими спостереженнями, грибне інфікування експлантатів сортів малини виявилось на 3–10-ту добу, а бактеріальне, дещо пізніше – на 10–15-ту добу культивування. Установлено, що для стерилізації експлантатів недоцільно використовувати 1,0 %-ний AgNO₃ упродовж 30 хв (варіант б) чи 25 %-ний H₂O₂ протягом 10 хв або 30 хв (варіанти 10 й 12), оскільки при цьому ефективність стерилізації була незначною. Надзвичайно низький

відсоток отримання асептичних життєздатних експлантатів фіксували за умови їх витримування у 2,5 %-ному NaClO протягом 30 хв (варіант 3). Застосування 2,5 %-ного розчину NaClO або 1 %-вого AgNO₃ упродовж 10 хв чи 25 %-ного H₂O₂ протягом 20 хв значно збільшувало ефективність стерилізації мікропагонів (понад 74 %). У результаті експериментальних досліджень, нами визначено умови стерилізації експлантатів малини (витримування 10 хв у 0,1 %-ному HgCl₂, варіант 8) з 92 %-вою ефективністю одержання асептичних життєздатних мікропагонів.

Нами встановлено, що інтенсивність активації бічних бруньок малини залежала від сортових особливостей і проявлялася у вигляді їх потовщення у середньому на 16-ту добу культивування (найшвидше активація відбувалася у Галинки на 5-ту добу культивування, а найповільніше – у Примара на 27-му добу) (рис. а).

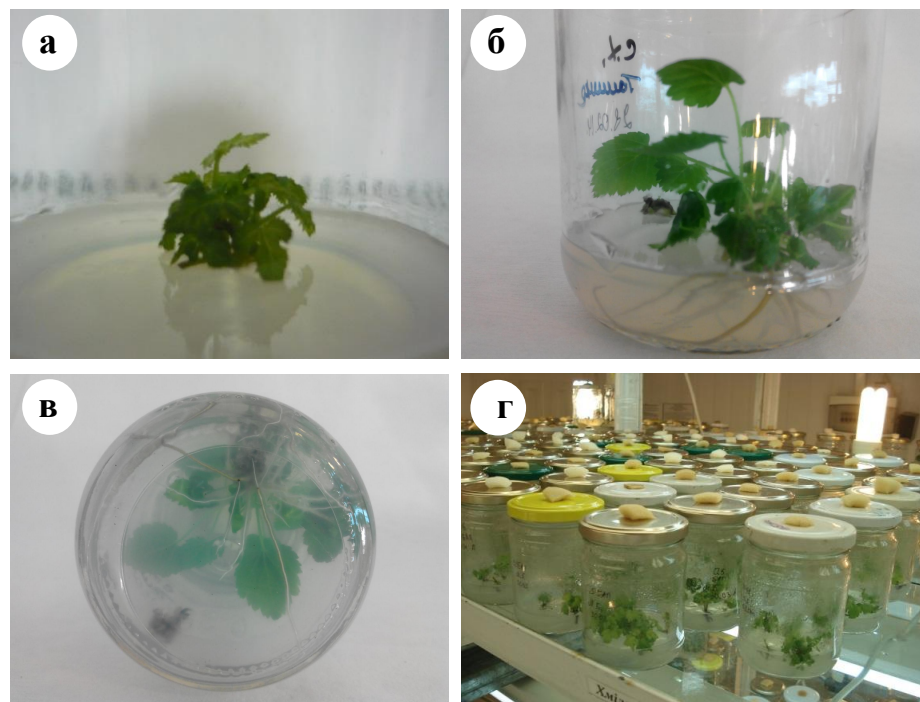


Рис. Послідовність створення колекції *in vitro* сортів малини в НУБіП України: а – асептичні життєздатні мікропагони малини сорту Осіння на безгормональному живильному середовищі, 30 діб у культурі *in vitro*; б – рослини-регенеранти малини сорту Галинка на МС з 1,0 мг·л⁻¹ ІМК й 0,5 мг·л⁻¹ кінетину; в – коренева система малини сорту Благородна на МС з 1,0 мг·л⁻¹ БАП та ІМК й 5 г·л⁻¹ активованого вугілля; г – масове клонування рослин *in vitro* сортів малини

На 10–30-ту добу культивування (залежно від сорту) активовані з бруньок мікропагони завдовжки 1,0–1,5 см відділяли від експлантату і субкультивували на модифіковані регуляторами росту живильні середовища. У наших дослідженнях як індуктори диференціації та морфогенезу в культурі ізольованих тканин і органів сортів малини *in vitro* використовували БАП, кінетин, НОК, ІОК й ІМК та визначали їх вплив на регенерацію мікропагонів, тип мікроклонального розмноження, коефіцієнт розмноження, тривалість циклу культивування й отримання рослин-регенерантів (табл. 2).

2. Мікроклональне розмноження сортів малини

Варіант	Живильне середовище	Морфометричні показники мікропагонів <i>in vitro</i>			Тривалість циклу культивування, дб	Тип мікроклонального розмноження	Призначення живильного середовища
		довжина мікропагона, см,	довжина кореневої системи, см	коефіцієнт розмноження			
1	2	3	4	5	6	7	8
Осінь							
1	МС безгормональне	1,3–1,9	–	–	15–20	–	Уведення у культуру <i>in vitro</i>
2	МС з подвійною концент. Fe-хелату, 1,0 мг·л ⁻¹ БАП, 0,1 мг·л ⁻¹ ІМК й 5 г·л ⁻¹ а. в. ¹	3,0–5,0	5,0–15,1	1:8–1:14	80–90	а. р.м. е. ² , п. м. ³	мкр. ⁴ , отримання р.-р. ⁵
Галинка							
3	МС з 0,5 мг·л ⁻¹ БАП й 0,1 мг·л ⁻¹ ІМК	1,5–2,0	–	–	5–10	–	Уведення у культуру <i>in vitro</i>
4	МС з 0,5 мг·л ⁻¹ БАП й кінетину	1,0–2,0	–	1:4–1:5	30–35	п. м.	мкр.
5	МС з 1,0 мг·л ⁻¹ ІМК й 0,2 мг·л ⁻¹ НОК	2,0–2,5	–	1:5	35–45	а. р. м. е.	мкр.
6	½ МС з 2,0 мг·л ⁻¹ ІМК	1,8–2,3	2,0–6,0	1:6	50–60	а. р. м. е.	мкр., отримання р.-р.

продж. табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8
7	МС з половинною концентрацією макросолей, інозиту та глюкози, $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІОК й $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП	2,0–3,5	2,5–10	1:9–1:11	40–45	а. р. м. е.	мкр., отримання р.-р.
8	МС з $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК й $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину	2,0–4,0	3,0–9,0	1:11–1:15	80–90	а. р. м. е.	мкр., отримання р.-р.
Благородна							
9	МС з $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину	1,0–1,5	–	–	15–20	–	Уведення у культуру <i>in vitro</i>
10	МС з $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП й $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК	1,2–2,3	–	1:4	20–30	п. м.	мкр.
11	МС з $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП й кінетину	0,5–1,0	–	1:3	25–35	п. м.	мкр.
12	МС з половинною концентрацією макросолей, інозиту та глюкози, $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІОК й $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП	0,5–2,5	1,1–3,2	1:2–1:4	30–40	а. р. м. е., п. м.	мкр., отримання р.-р.
13	МС з подвійною концент. Fe-хелату, $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП й ІМК й $5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ а. в. ¹	2,0–3,0	1,2–3,3	1:2	30–35	а. р. м. е.	мкр., отримання р.-р.
Херігейдж							
14	МС безгормональне	1,0–1,5	–	–	15–25	–	Уведення у культуру <i>in vitro</i>
15	МС з $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП й кінетину	0,5–1,0	–	1:4	55–60	п. м.	мкр.
16	МС з половинною концентрацією макросолей, інозиту та глюкози, $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІОК й $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП	1,0–2,5	3,2–5,1	1:6	30–35	а. р. м. е., п. м.	мкр., отримання р.-р.
Промінь							
17	МС з $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ БАП й $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК	0,8–1,5	–	–	15–20	–	Уведення у культуру <i>in vitro</i>

1	2	3	4	5	6	7	8
18	½ МС з 2,0 мг·л ⁻¹ ІМК	1,8–2,5	1,5–3,0	1:4	25–30	а. р. м. е.	мкр., отримання р.-р.
Відбірна							
19	МС безгормональне	0,5–0,8	–	–	20–30	–	Уведення у культуру <i>in vitro</i>
20	МС з 0,5 мг·л ⁻¹ БАП й кінетину	0,6–1,0	–	1:3	30–35	а. р. м. е.	мкр.
Примара							
21	МС з 0,5 мг·л ⁻¹ БАП й 0,1 мг·л ⁻¹ ІМК	0,8–1,1	–	–	27–35	–	Уведення у культуру <i>in vitro</i>
22	МС з половинною концентрацією макросолей, інозиту та глюкози, 1,0 мг·л ⁻¹ ІОК й 0,1 мг·л ⁻¹ БАП	0,5–1,5	–	1:3	25–30	а. р. м. е.	мкр.
Примітки: 1. Активоване вугілля (а. в.). 2. Активація росту меристем експлантату (а. р. м. е.). 3. Прямий морфогенез (п. м.). 4. Мікроклональне розмноження (мкр.). 5. Рослини-регенеранти (р.-р.).							

У результаті проведених досліджень встановлено склад живильного середовища для введення експлантатів досліджуваних сортів малини у культуру *in vitro*. Мікропагони сортів малини Осіння, Херітейдж та Відбірна необхідно упродовж 15–30-ти діб культивувати на безгормональному живильному середовищі МС. Показано, що експлантати таких сортів як Галинка, Благородна, Промінь та Примара уже в перші доби культивування характеризувалися вимогливістю до складу живильного середовища. Вирощування *in vitro* останніх на МС безгормональному призводило до набуття мікропагонами не характерної для сорту пігментації та надзвичайно малого середньомісячного приросту (0,1–0,3 мм).

Досліджувані сорти малини мікроклонально розмножені за використання активації росту меристем експлантата (а. р. м. е.; варіант 5,

Галинка; варіант 13, Благородна), прямого морфогенезу (п. м.; варіант 15, Херітейдж) та змішаного типу морфогенезу (а. р. м. е. і п. м.; варіант 2, Осіння; варіант 16, Херітейдж; варіант 12, Благородна). Для таких сортів малини, як Осіння (варіант 2), Галинка (варіанти 6, 7, 8), Благородна (варіанти 12, 13, рис. в), Херітейдж (варіант 16), Промінь (варіант 18) підібрані компоненти живильного середовища, що забезпечують масове мікроклональне розмноження (рис. б), укорінення мікропагонів (рис. в) та отримання рослин-регенерантів (рис. г). Нами також експериментально встановлено цикли культивування рослин-регенерантів, які залежать від складу живильних середовищ та сортів малини: найкоротший (25–30 діб) фіксували у сорту Промінь на живильному середовищі $\frac{1}{2}$ МС з додаванням $2,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІМК, а найтриваліший (80–90 діб) – у сортів Осіння та Галинка на МС з подвійною концентрацією Fe-хелату, $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП, $0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІМК й $5 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ активованого вугілля та МС з $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІМК й $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ кінетину, відповідно.

Отже, розроблена нами біотехнологія мікроклонального розмноження сортів малини дозволяє отримувати значну кількість рослин-регенерантів та створювати колекцію рослин *in vitro* різного цільового використання.

Висновки. За умов стерилізації експлантатів досліджуваних сортів малини у 0,1 %-ному розчині HgCl_2 протягом 10 хв вихід асептичних життєздатних мікропагонів становить 90 %.

За використання різних типів морфогенезу отримано рослини-регенеранти восьми сортів малини зі значним коефіцієнтом розмноження на таких живильних середовищах: МС з подвійною концентрацією Fe-хелату з додаванням $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП, $0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІМК й $5 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ активованого вугілля – для малини сорту Осіння; МС з $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІМК й $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ кінетину – для сорту Галинка; МС з половинною концентрацією макросолей, інозиту та глюкози, $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІОК й $0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП – для Благородна й Херітейдж.

Підібрано оптимальний склад живильних середовищ для мікроклонального розмноження малини сорту Промінь ($\frac{1}{2}$ МС з $2,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$

ІМК), Відбірна (МС з $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП й кінетину) й Примара (МС з половинною концентрацією макросолей, інозиту та глюкози, $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІОК й $0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП).

З рослин-регенерантів сортів малини Осіння, Галинка, Благородна, Відбірна, Промінь, Сяйво, Херітейдж і Примара створено колекцію *in vitro* для різного цільового використання.

Список літератури

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р. Г. Бутенко – М. : Наука, 1964. – 272 с.
2. Высоцкий В. А. Усовершенствование способов получения растений малины из изолированных меристематических верхушек / В. А. Высоцкий // Ягодководство в Нечерноземье. –1984. – № 5. – С. 3–8.
3. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. – К. : Наукова думка, 1980. – 488 с.
4. Мохаммед А. И. Сортвые особенности клонального микроразмножения малины красной / А. И. Мохаммед, Р. Г. Бутенко // Физиология растений. – 1998. – Вип. 45, № 5. – С. 738–740.
5. Туровская Н. И. Микроклональное размножение малины / Н. И. Туровская, О. В. Стрыгина // Садоводство и виноградарство. – 1990. – №8. – С. 26–29.
6. Шеренговий П. З. Каталог сортів ягідних і плодових культур селекції Національного аграрного університету / П. З. Шеренговий. – К.: ВЦ НУБіП України, 2004.– 48 с.
7. Murashige T. A revised medium for rapid, growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473.
8. Welander M. *In vitro* culture of raspberry (*Rubus idaeus*) for mass propagation / M. Welander // *J. Hort. Sci.* – 1985. – Vol. 60, №4. – P. 142– 145.

Биотехнологические аспекты создания коллекции *in vitro* сортов малины в НУБиП Украины

Лиханов А. Ф., Чернобров О. Ю., Клюваденко А. А., Мельничук М. Д.

Установлены условия получения асептических жизнеспособных эксплантов восьми сортов малины. Разработана биотехнология их микроклонального размножения, включающая подбор компонентов питательных сред для различных этапов и типов морфогенеза и позволяющая получать значительное количество растений-регенерантов. Создана коллекция ценных сортов малины *in vitro* различного целевого использования в НУБиП Украины.

Ключевые слова: *культура in vitro, эксплантаты, питательная среда, микроклональное размножение, растения-регенеранты малины, коллекция сортов малины in vitro*

Biotechnological aspects of creation collection *in vitro* of varieties raspberry in NUBiP Ukraine

Likhanov A., Chornobrov O., Kliuvadenko A., Melnychuk M.

The conditions of obtaining viable aseptic explants of varieties of eight raspberry in NUBiP Ukraine. A biotechnology microclonal their reproduction, which includes the selection of the components of culture media for different types and stages of morphogenesis and allows to obtain a large number of plants-regenerants. A collection of varieties of raspberries *in vitro* different intended use.

Key words: *culture in vitro, explants, medium, micropropagation, plant-regenerant of raspberries, collection in vitro of varieties of raspberries*