

УДК 634.75:58.085

DOI 10.30679/2587-9847-2022-35-13-17

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ЕЖЕВИКИ (*RUBUS*) СОРТА КАРАКА БЛЭК *IN VITRO***Карпушина М.В., канд. с.-х. наук, Амосова М.А., канд. с.-х. наук***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (Краснодар)*

Реферат. В статье изложены результаты экспериментальных исследований размножения ежевики сорта *Карака Блэк* (*Karaka Black*) методом *in vitro*. Целью исследований является подбор наиболее эффективной концентрации цитокинина 6-БАП для эффективного микроразмножения ежевики. Были испытаны 4 варианта сред, состоящих из солей Мурасиге и Скуга (МС), мио-инозита – 100 мг/л, витамина В₁ – 1 мг./л, витамин В₆ – 0,5 мг/л, никотиновая кислота – 0,5 мг/л, 36,7 мг/л FeNaЭДТА и, как регулятор роста, 6- бензиламинопурин (6 БАП) в концентрациях 0,5, 0,75, 1,0 и 1,25 мг/л. В условиях *in vitro* укоренение побегов и фрагментов побегов, проводили на среде, состоящей из модифицированной среды МС + 1,0 мг/л ИМК. На этапе адаптации к условиям *ex-vitro* использовался субстрат, состоящий из смеси торфа и перлита в соотношении 1:1. Выход адаптированных растений составил 98%.

Ключевые слова: ежевика, микроразмножение, культура *in vitro*, мультипликация, 6 БАП

Summary. The article presents the results of experimental studies of the *in vitro* micropropagation of blackberry variety *Karaka Black*. The aim of the research is to select the most effective concentration of cytokinin 6-BAP for effective micro-propagation of blackberries. Four variants of media were tested, consisting of Murashige and Skoog salts (MS), myo-inositol – 100 mg/l, vitamin B₁ – 1 mg./l, vitamin B₆ – 0.5 mg/l, nicotinic acid – 0.5 mg/l, 36.7 mg/l FeNaEDTA and, as a growth regulator, 6-benzylaminopurine (6 BAP) at concentrations of 0.5, 0.75, 1.0 and 1.25 mg/l. Under *in vitro* conditions, the rooting of shoots and shoot fragments was carried out on a medium consisting of a modified MS medium + 1.0 mg/l IBA. At the stage of adaptation to *ex-vitro* conditions, a substrate was used, consisting of a mixture of peat and perlite in a ratio of 1:1. The number of adapted plants was 98%.

Key words: blackberry, micropropagation, *in vitro* culture, multiplication, 6 BAP

Введение. Ежевика (*Rubus spp.*) является одной из хозяйственно ценных ягодных культур, которая широко культивируется в Европейских странах и Северной Америке на площади более 20 000 га [1].

Современный мировой сортимент этой культуры насчитывает около 400 сортов, в активном использовании в разных странах находятся примерно 100 из них, в том числе, на территории России около 40 сортов [2].

В последние годы интерес фермеров к производству ягод в т.ч. и ежевики значительно возрос. Ежевику успешно выращивают в Республике Крым, Ставропольском крае и др. регионах России. В 2020 г. в структуре общей площади многолетних насаждений на долю всех ягодников приходилось 20,1 % [3], общая площадь составляет около 100 тыс. га, которые в основном сосредоточены в хозяйствах населения, КФХ, ИП [4]. В связи с этим, возрастает необходимость в производстве большого количества качественного посадочного материала.

Размножение ежевики традиционными методами очень эффективно осуществляется отводками, корневыми или стеблевыми черенками. Однако методом микроразмножения можно получать более значимое количества растений, что обусловлено несравнимо более высокой скоростью размножения по сравнению с обычными, что делает возможным массовое и чрезвычайно быстрое размножение ценных генотипов, независимо от времени года и получение чистого биологического материала.

Технологию микроразмножения ежевики совершенствовали многие исследователи [5-10]. Чаще всего для размножения используется среда Мурасиге-Скуга, которую считают универсальной для культивирования большинства видов растений, в том числе и для ежевики [11], с учетом генотипических особенностей ежевики оценивается влияние различных ростовых веществ на этапе микроразмножения и укоренения (6-БАП, ГК₃, ИМК), обрабатывается адаптация растений к нестерильным условиям [12-13].

Целью наших исследований является подбор наиболее эффективной концентрации цитокинина 6-БАП для эффективного микроразмножения ежевики сорта *Карака Блэк*.

Объекты и методы исследований. Исследуемый сорт *Карака Блэк* представляет собой слабошипный сорт новозеландского происхождения, широко распространенный в Америке и Европе. Сорт *Карака Блэк* - сорт раннего срока созревания с длительным плодоношением (конец июня и последующие 6-8 недель). Главное достоинство сорта – крупные ягоды, по внешнему виду напоминающие ягоды шелковицы. В длину достигают до 5 см, средний вес — 10 г, отдельные ягодки могут иметь массу 17 г [14].

Исследования проводились в лаборатории вирусологии ФГБНУ СКФНЦСВВ. Первичные экспланты ежевики *in vitro* получены из НПЦ «Фитогенетика» г. Тула.

Работу проводили по общепринятым методикам [15, 16]. На этапе микроразмножения в питательную среду Мурасиге – Скуга (МС) вводился регулятор роста 6-БАП в концентрациях 0,5; 0,75; 1,0 и 1.25 мг/л. На этапе укоренения использовалась среда МС (сахароза 20 г/л) с добавлением 1,0 мг/л ИМК и среда без ауксина (контроль). Культивировали растения при 16- часовом фотопериоде (свет / темнота 16/8 ч) при температуре 25 ± 2 °С и освещенности 2500-3000 люкс.

Полученные растения адаптировали к условиям *ex vitro* после 6 недель укоренения. Растения высаживали в минипарники, содержащие стерилизованную почвенно-торфяную смесь + перлит (1:1), проливали $\frac{1}{2}$ раствором макросолей МС и содержали в фитотроне 16- часовом фотопериоде, температуре 22 ± 2 °С при освещенности 6000 люкс. Процент адаптированных растений регистрировали через 20 дней после пересадки.

Исследование проводилось на базе ЦКП «Исследовательско-селекционная коллекция генетических ресурсов садовых культур» ФГБНУ СКФНЦСВВ.

Обсуждение результатов. При пересадке растений по вариантам опыта использовали микрочеренки ежевики длиной 1-1,5 см, содержащие в среднем 2 узла (рис. 1). Учет проводили спустя 4 недели культивирования. Хорошая пролиферация побегов отмечена во всех вариантах опыта.

Анализ полученных результатов показал, что рост наиболее качественных побегов, готовых к этапу укоренения, проходит на средах с добавлением 6-БАП в количестве 0,5 и 0,75 мг/л.



Рис. 1. Инокуляция ежевики на питательную среду МС

На среде с 6-БАП 0,5 мг/л образуется в среднем 15 микропобегов (минимально 10 шт./эксплант, максимально 19 шт./эксплант), из которых 50 % побегов подходит для

этапа укоренения (рис. 2). На среде с *6-БАП* в количестве 0,75 мг/л от одного экспланта можно получить всего от 6 до 9 микропобегов, однако 90-100 % этих побегов имеют размер, подходящий для этапа ризогенеза.

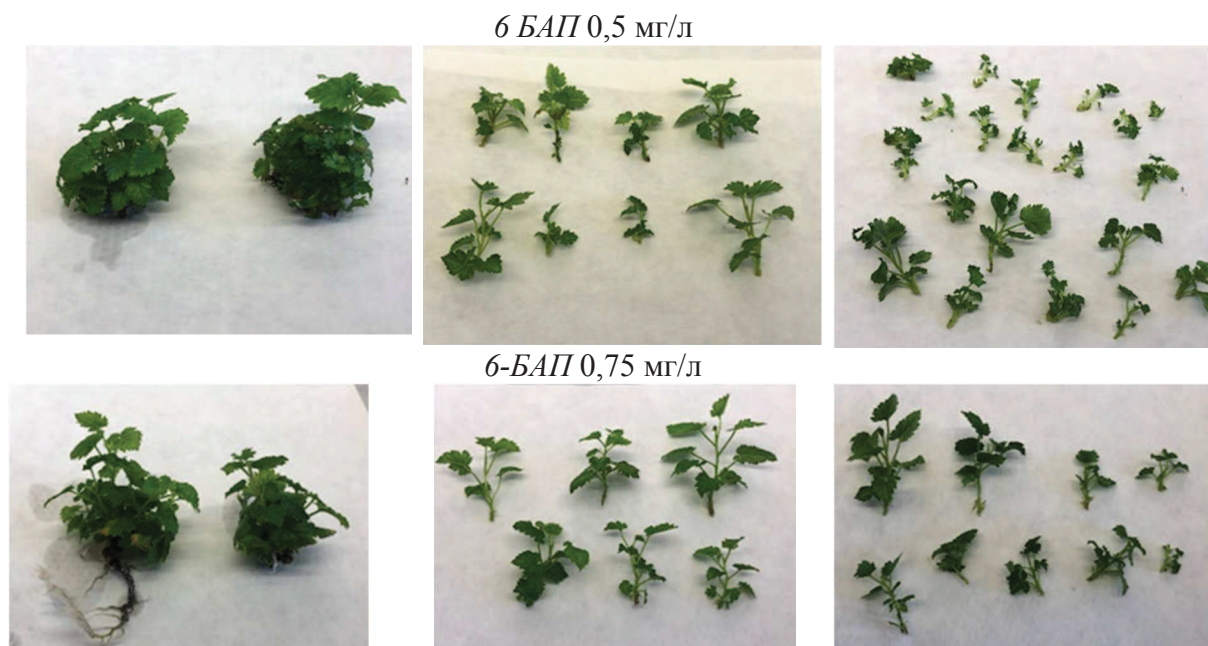


Рис. 2. Эффективность микроразмножения ежевики сорта *Карака Блэк* в условиях *in vitro*, в зависимости от концентрации *6-БАП*

На средах, содержащих *6-БАП* в количестве 1,0 и 1,25 мг/л, количество побегов образующихся из одного экспланта варьировало от 7 до 21 штук, однако большая их часть (82-93 %) имела маленький размер и требовала дополнительного доращивания (рис. 3).



Рис. 3. Эффективность микроразмножения ежевики сорта *Карака Блэк* в условиях *in vitro*, концентрация *6-БАП* 1,0 мг/л

На этапе ризогенеза с использованием ауксина ИМК (1,0 мг/л) корнеобразование составляло 93%. На одном микрорастении формировалось от 5 до 10 корней, длиной от 2 до 10 см, а растения достигали 6-7 см в длину (рис. 4). Такие растения, впоследствии, лучше адаптировались к нестерильным условиям.

Вместе с тем, на среде, не содержащей ауксина, корнеобразование проходило, но менее активно. На одном растении формировалось от 2 до 5 корней, длиной до 2-2,5 см, сами растения достигали 4-5 см в длину (рис. 4).

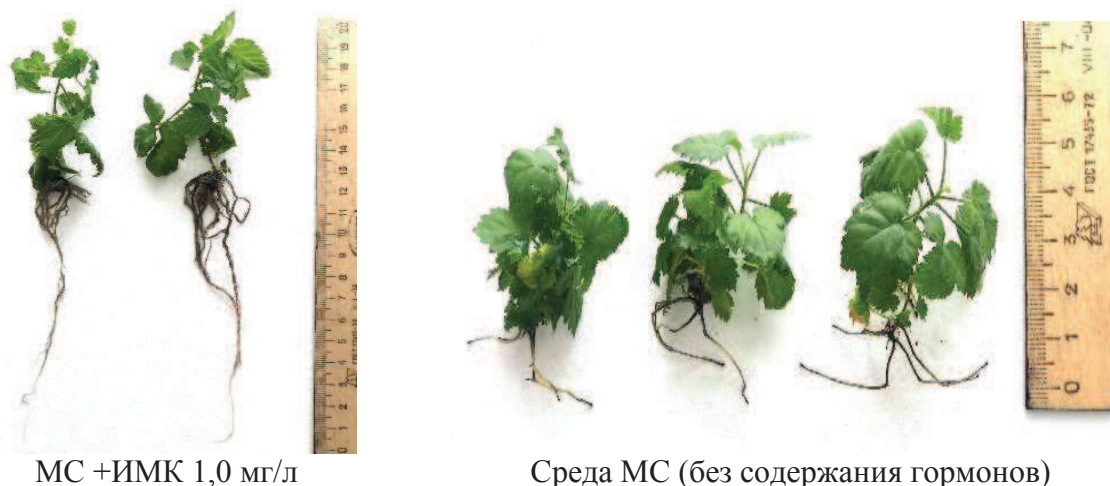
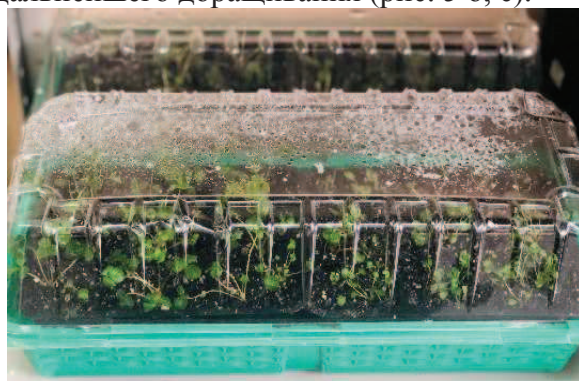


Рис. 4. Корнеобразование ежевики сорта *Карака Блэк*, в зависимости от питательной среды

Адаптация к условиям *ex vitro* является завершающей стадией процесса клонального микроразмножения. Успешная адаптация зависит от ряда факторов: от вида растения, физиологического состояния растения; состава, стерильности и влажности субстрата, интенсивности и частоты освещения; влажности и температуры помещения [4]. На сегодняшний день не существует универсальной технологии адаптации регенерантов разных видов растений к нестерильным условиям. Очень важно создать оптимальные условия, при которых надземная и подземная части будут успешно развиваться.

По данным исследования Lepse L др. [12] укоренение ежевики, проведенное в торфяном субстрате, дает значительно более высокий выход укорененных растений, чем укоренение *in vitro*.

В нашем исследовании адаптацию, укоренившихся микропобегов, проводили на субстрат, состоящий из смеси торфа и перлита в соотношении 1:1. Контейнеры с микрорастениями помещали в микропарники для поддержания оптимальной влажности воздуха 95 % (рис. 5а). Спустя 2 недели адаптации проводили постепенное снижение влажность воздуха. За 3 недели растения ежевики адаптировались. Через 1-1,5 месяца адаптированные растения ежевики пересаживали в контейнеры объемом 200 мл для дальнейшего доращивания (рис. 5 б, с).



Акклиматизация

а



1 месяц адаптации

б



3 месяца адаптации

с

Рис. 5. Адаптация и доращивание растений ежевики

Выводы.

1. На этапе мультипликации ежевики сорта *Карак Блэк*, для получения наибольшего количества микропобегов следует использовать среду МС с добавлением 6-БАП в количестве 1,0-1,25 мг/л, при этом образуется максимальное количество побегов до 21 шт./эксп.

2. На этапе, предшествующему укоренению, следует снизить количество 6-БАП до 0,5 мг/л, при этом коэффициент размножения составляет 6-9 побегов/эксп. и микропобеги имеют размер пригодный для этапа укоренения (1,5-2 см и более).

3. На этапе ризогенеза рекомендуется использовать среду МС с добавлением ауксина ИМК - 1,0 мг/. При этом у растения формируется хорошая корневая система, и адаптация таких растений достигает 98 %.

Литература

1. Strik B.C., Clark J.R., Finn C., Vanados M.P. Worldwide blackberry production // HortTechnology. 2007. Vol. 17. № 2. P. 205-213.
2. Грюнер Л.А., Кулешова О.В. Актуальные направления селекции и новые элитные формы ежевики генофонда ВНИИСПК // Современное садоводство. 2018. №3 (27). С. 81-89.
3. Минаков И.А., Малюков В.В. Проблемы и перспективы развития ягодоводства в России // Наука и образование. 2022. Том 5. №2. Режим доступа: <http://opusmgau.ru/index.php/see/article/view/4558/4594> (дата обращения: 12.06.2022).
4. Ягодный бизнес 2020 года: объем переработки увеличится на 18%, дефицит свежих ягод сохранится. Режим доступа: <https://logistics.ru/produkty-pitaniya-i-fresh/yagodnyy-biznes-2020-goda-obem-pererabotki-uvelichitsya-na-18-deficit> (дата обращения: 12.06.2022).
5. Badescu G.h., Botez M., Badescu L., Enache E. Intensive methods for blueberry propagation // Acta Hort. 1985. Vol. 165. P. 189-196.
6. Сковородников Д.Н., Милехина Н.В., Орлова Ю.Н. Особенности клонального микроразмножения ежевики и малино-ежевичных гибридов // Вестник БГУ. 2015. №3. С. 417-419.
7. Таварткиладзе О. К., Вечернина Н. А. Размножение ежевики в культуре *in vitro* // Известия АлтГУ. 2007. №3. С. 28-29.
8. Borodulina I.D., Plaksina T.V., Panasenko V.N., Sokolova G.G. Optimization of blackberry clonal micropropagation // Ukrainian Journal of Ecology. 2019. Vol. 9. №. 3. P. 339-345.
9. Макаров С.С., Кузнецова И.Б., Влияние регуляторов роста при клональном микроразмножении ежевики // Лесохозяйственная информация. 2017. №4. С. 46-50.
10. Bobrowski V.L., Mello-Farias P., Petters J. Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars // Current Agricultural Science and Technology. 1996. Vol. 2. №. 1. P. 17-20.
11. Ташматова Л.В., Грюнер Л.А., Мацнева О.В. Особенности клонального микроразмножения ежевики с различной формой роста // Современное садоводство. 2014. №4. С. 60-63.
12. Lepse L., Laugale V. Micropropagation, Rooting and Acclimatization of Blackberry 'Agavam' // I International Symposium on Biotechnology of Fruit Species: BIOTECHFRUIT2008. 2008. Vol. 839. P. 43-49.
13. Vescan L.A., Clapa D., Fira A., Pamfil D. Micropropagation of cold resistant blackberry cultivar 'Gazda' // Bulletin USAMV Animal Sciences and Biotechnologies. 2012. Vol. 69. №. 1-2. P. 282-289.
14. Ежевика Карак блэк – чемпион по крупноплодности. Режим доступа: <https://diz-cafe.com/sad-ogorod/ezhevika-karaka-blek.html> (дата обращения 15.06.2022).
15. Джигадло Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Орел: ГНУ ВНИИСПК, 2005. 51с.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. 1962. Vol. 15(3). P. 473-497.