

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ И ДЕПОНИРОВАНИЕ ПОДВОЕВ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР

Х. И. БОБОДЖАНОВА, Ш. К. ЯСАУЛОВА

Центр биотехнологии Таджикского национального университета,
г. Душанбе, Таджикистан, 734025, e-mail: bobojankh_7@bk.ru

Н. В. КУХАРЧИК

РУП «Институт плодоводства»,
аг. Самохваловичи, Республика Беларусь, 223013, e-mail: nkykhardtchik@gmail.com

(Поступила в редакцию 16.10.2024)

В данной статье представлены результаты исследований за период 2022–2024 гг. по оценке эффективности микро-размножения *in vitro* подвоев косточковых культур. Исследования проведены на базе лабораторий Центра биотехнологии Таджикского национального университета.

На этапе введения получены жизнеспособные экспланты 3 форм подвоев, эффективность инициации культуры *in vitro* при двухступенчатой стерилизации с использованием этанола и перекиси водорода составила 100 %.

Отмечена разная регенерационная способность в культуре *in vitro* на этапе микроразмножения эксплантов исследованных подвоев в течение шести пассажей. Установлены одинаковые (1,0) коэффициенты микроразмножения в первом пассаже для исследованных трех типов подвоев. Высокий коэффициент микроразмножения отмечен во втором пассаже для подвоя Colt (2,6), в третьем пассаже для подвоя Myrobalan 29C (3,0). Коэффициент микроразмножения микропобегов подвоя VVA-1 варьировал от 1,4 во втором и 1,6 в пятом пассаже. На шестом пассаже отмечено пожелтение и некроз микропобегов подвоя VVA-1.

Сохранность регенерантов подвоев Myrobalan 29C и Colt в результате депонирования низкая (29,4–26,7 %), однако достаточно высокие коэффициенты размножения (3,3–8,0) данных подвоев после хранения при низких температурах позволяют получать в дальнейшем посадочный материал.

Ключевые слова: Республика Таджикистан, питомниководство, подвои косточковых культур, *in vitro*, эксплант, микро-размножение, хранение.

This article presents the results of studies for the period 2022–2024 to assess the efficiency of in vitro micropropagation of stone fruit rootstocks. The studies were conducted at the laboratories of the Biotechnology Center of the Tajik National University.

At the introduction stage, viable explants of 3 rootstock forms were obtained, the efficiency of in vitro culture initiation with two-stage sterilization using ethanol and hydrogen peroxide was 100 %.

Different regenerative capacity in in vitro culture was noted at the stage of micropropagation of explants of the studied rootstocks over six passages. The same (1.0) micropropagation coefficients were established in the first passage for the three types of rootstocks studied. A high micropropagation coefficient was noted in the second passage for the Colt rootstock (2.6), in the third passage for the Myrobalan 29C rootstock (3.0). The coefficient of micropropagation of microshoots of the VVA-1 rootstock varied from 1.4 in the second and 1.6 in the fifth passage. Yellowing and necrosis of microshoots of the VVA-1 rootstock were noted in the sixth passage.

The survival rate of regenerants of Myrobalan 29C and Colt rootstocks as a result of deposition is low (29.4–26.7 %), however, sufficiently high coefficients of propagation (3.3–8.0) of these rootstocks after storage at low temperatures allow obtaining planting material in the future.

Key words: Republic of Tajikistan, nursery farming, rootstocks of stone fruit crops, *in vitro*, explant, micropropagation, cold storage.

Ведение

Питомниководство – отрасль растениеводства, в которой осуществляется выращивание саженцев субъектами хозяйственной деятельности в области питомниководства, с соблюдением требований стандартов и технических регламентов.

В Республике Таджикистан принят закон о питомниководстве в соответствии с которым установлены правовые, организационные и экономические основы выращивания и реализации плодовых, вечнозеленых и декоративных саженцев [1].

Развитие современного плодоводства предполагает повышение продуктивности насаждений и снижение себестоимости производства продукции путем создания низкорослых уплотненных посадок интенсивного типа. Одной из составляющих решения этой задачи является использование в производстве зимостойких клоновых подвоев карликовой силы роста, устойчивых к бактериальным, грибным и вирусным болезням, способных размножаться вегетативно отводками и обеспечивать формирование высокого качества урожая. Преимущество их использования доказано опытом зарубежных стран таких, как Англия, Германия, Польша, Канада, США и другими.

Интенсивные сады требуют создания мощной базы безвирусных оригинальных маточников клоновых подвоев, маточно-черенковых садов, возделываемых по новой технологии, и перевод питомников на выращивание безвирусного высококачественного посадочного материала, отвечающего всем современным требованиям.

Мировой научный и производственный опыт показывает, что один из самых перспективных путей оздоровления и ускоренного размножения клоновых подвоев и сортов плодовых с целью создания безвирусного, оригинального пребазисного генфонда маточных растений, базисных и базовых маточников клоновых подвоев и маточно-черенковых садов яблони является клональное микроразмножение. Высококачественные подвой различных видов плодовых культур могут быть использованы для производства оздоровленного посадочного материала и закладки промышленных насаждений.

Экономическая стабильность производства фруктов напрямую связана с продуктивностью садов и товарно-рыночными отношениями. Повышение урожайности деревьев в саду с сохранением высокого качества плодов зависит от многих факторов. Климатические колебания, нарушения технологии по уходу за насаждениями, качество посадочного материала – возможная отдаленная несовместимость сорто-подвойных комбинаций и их адаптивность к условиям конкретного участка являются существенным испытанием их жизнеспособности. Выбор подвоев подчас не менее важен, чем выбор сорта, особенно при загущенных схемах посадки или с возникновением проблем, связанных с пересадкой растений из плодового питомника в сад [2].

Цель работы – изучить регенерацию эксплантов клоновых подвоев косточковых культур в культуре *in vitro*, определить потенциал микроразмножения *in vitro* до и после хладохранения.

Основная часть

Объектами исследований выбраны подвой из коллекционного участка Филиала института садоводства и овощеводства им. Мичурина Таджикской академии сельскохозяйственных наук, Согдийская область, район Б. Гафурова, джамоат Овчи Калача, село им. Мичурина.

ВВА-1 (*Prunus tomentosa* Trumb. x *P. cerasifera* Ehrh.). Оригинатор – Крымская опытно-селекционная станция СКЗНИИСиВ. Авторы: Г. В. Еремин, В. Ф. Гавриш, Ф. П. Криченко, В. Ф. Мирская. Сила роста деревьев слабая – 40–50 % по сравнению с деревьями на традиционных подвоях. Продуктивный период деревьев сливы и алычи на этом подвое составляет 12–15 лет. По сравнению с сильнорослыми подвоями плоды при прививке на ВВА-1 созревают на 7–10 дней раньше и не мельчают. Деревья корневой поросли не образуют. Подвой может быть использован для насаждений с плотностью размещения деревьев до 2500 шт/га и больше [3]. ВВА-1 отличается высокой зимостойкостью, корни выдерживают промерзание почвы до – 15 °С. Устойчив к плотным почвам, затоплению и корневым гнилям. Чувствителен к хлорозу и корневому раку, плохо переносит засуху. Хорошо совместим со всеми сортами сливы, абрикоса, алычи, удовлетворительно – с персиком. Обеспечивает хорошую якорность, скороплодность и высокую продуктивность привитых деревьев [4].

Myrobalan 29C – является одним из видов американской алычи (*Prunus cerasifera* Ehrh.). Рекомендован как среднерослый подвой для алычи, сливы и абрикоса, хорошо приспосабливается к разным типам почв и климату, распространён во многих садоводческих районах Европы. Обеспечивает хорошую приживаемость саженцев, устойчив к содержанию активных известняков и к асфиксии корней, размножается отводками, зелёными и одревесневшими черенками. В Республику Таджикистан завезен в 2012 г. В качестве вегетативного подвоя для сливы и абрикоса в США, Италии, Франции, Хорватии, Англии, Румынии, Германии и других странах используется Миробалан 29 С, который хорошо растет на песчаных почвах, особенно там, где близко залегают грунтовые соленосные воды [5].

Colt (*Prunus avium* x *Prunus pseudocerasus*). – слаборослый подвой, выведен в Англии Тайдеманом Х. М. Получен от опыления черешни (*Cerasus avium*) вишней настоящей (*Cerasus pseudocerasus*). Совместим со всеми сортами черешни и вишни. У деревьев вишни, привитых на Колте, размеры крон на 20–45 % меньше, чем на сильнорослом подвое. Деревья рано вступают в плодоношение и дают обильные, регулярные урожаи. Способствует увеличению размера плодов. Маточные кусты пирамидальные, средних размеров. Побегов в кусте среднее количество, они обычно не имеют боковых разветвлений. Легко размножается одревесневшими черенками. Однолетние приросты, нарезанные сразу после листопада, можно высаживать для укоренения без предварительной тепловой обработки и воздействия на них стимуляторами корнеобразования. Колт не получил распространения из-за очень низкой, даже для южной зоны, морозостойкости корней и сильной подверженности заболеванию корневым раком [6]. По другим источникам, по силе роста, компактности крон, урожайности и срокам вступления деревьев в плодоношение от сеянцев горькой черешни *Prunus avium* не отличается [7].

Работа проводилась в Центре биотехнологии ТНУ в период с 2022 по 2024 гг.

Для введения в культуру *in vitro* использовали верхушечные почки из одревесневших черенков в период покоя.

Для соблюдения стерильности все процедуры проводили в условиях ламинар-бокса «Ламинар – С» – 1,2 (Россия). Отчленение меристем проводили с помощью бинокулярного микроскопа МБС-10 (Россия) и специального набора инструментов (игла, скальпель, пинцет). Растительный материал

тщательно промывался в проточной воде, затем в растворе моющего средства и вновь проточной водой. Срезанные скальпелем почки помещали в емкости с крышкой и проводили поэтапную стерилизацию с использованием спирта и перекиси водорода:

- погружение в 70%-ный этанол на 30сек;
- 2-кратная промывка в течение 1 мин каждая автоклавированной H_2O ;
- погружение в 33%-ную H_2O_2 на 10 мин;
- 3-кратная промывка автоклавированной H_2O в течение 1 мин каждая, затем однократная в течение 5 мин до полного удаления следов стерилизующего агента.

Выделенные экспланты переносили на стандартную агаризованную питательную среду Мурасига-Скуга [8], дополненную витаминами: B_1 и B_6 по 0,8 мг/л, РР – 1,0 мг/л, С – 10 мг/л; и биологически активными веществами: 6-БА (1,1мг/л) и НУК (0,09 мг/л) [9]. Для микроразмножения использовали питательную среду с витаминами: B_1 , B_6 и РР по 0,5 мг/л, С – 1 мг/л; и цитокинином 6-БА (0,5мг/л) [9]. Длительность субкультивирования – 45 дней.

Культивирование изолированных тканей растений *in vitro* осуществляли в светокультуральной комнате при температуре +22...+24 °С, влажности воздуха 70–80 %, фотопериоде 16/8 ч, освещенности 4000 лкс. Статистическую обработку полученных данных проводили по Б. А. Доспехову [10].

Эффективность стерилизации определяли долей жизнеспособных, инфицированных и некротизировавших эксплантов. Показатели жизнеспособности эксплантов, введенных в культуру *in vitro* представлены в табл. 1. На этапе введения получены жизнеспособные экспланты. Случаев некроза, инфицирования не обнаружено. Приживаемость эксплантов всех исследуемых в работе образцов при двухступенчатой стерилизации с использованием этанола и перекиси водорода составила 100 %.

Таблица 1. Показатели жизнеспособности эксплантов

Образец	Количество эксплантов, шт.		
	введенных	жизнеспособных	
		шт	%
ВВА-1	40	40	100
Colt	40	40	100
Myrobalan 29C	40	40	100

Высаженные экспланты подвоев показали хороший рост уже в первые дни развития (рис. 1).

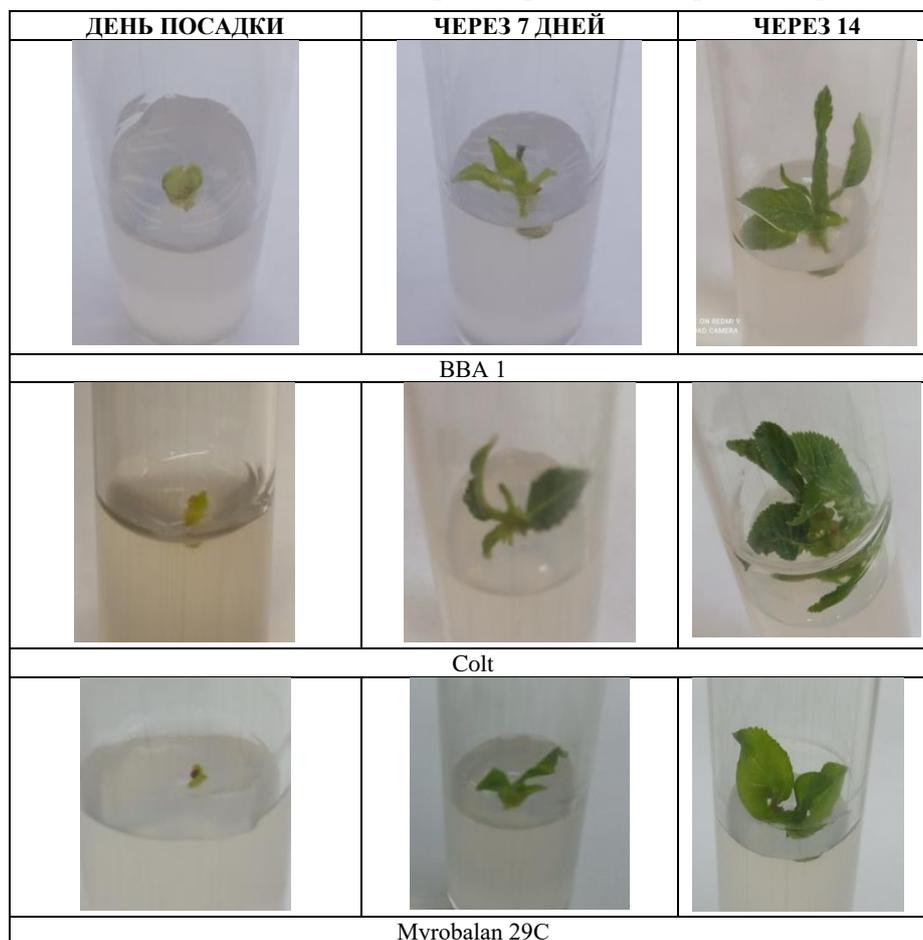


Рис. 1. Развитие эксплантов подвоев косточковых культур в течение 14 дней

После первого этапа ввода, через 45 дней после высадки, хорошо развитые меристемы пересаживали на питательную среду для микрклонального размножения. Последующие наблюдения за жизнеспособными эксплантами показали хорошее развитие конгломератов микропобегов (рис. 2).

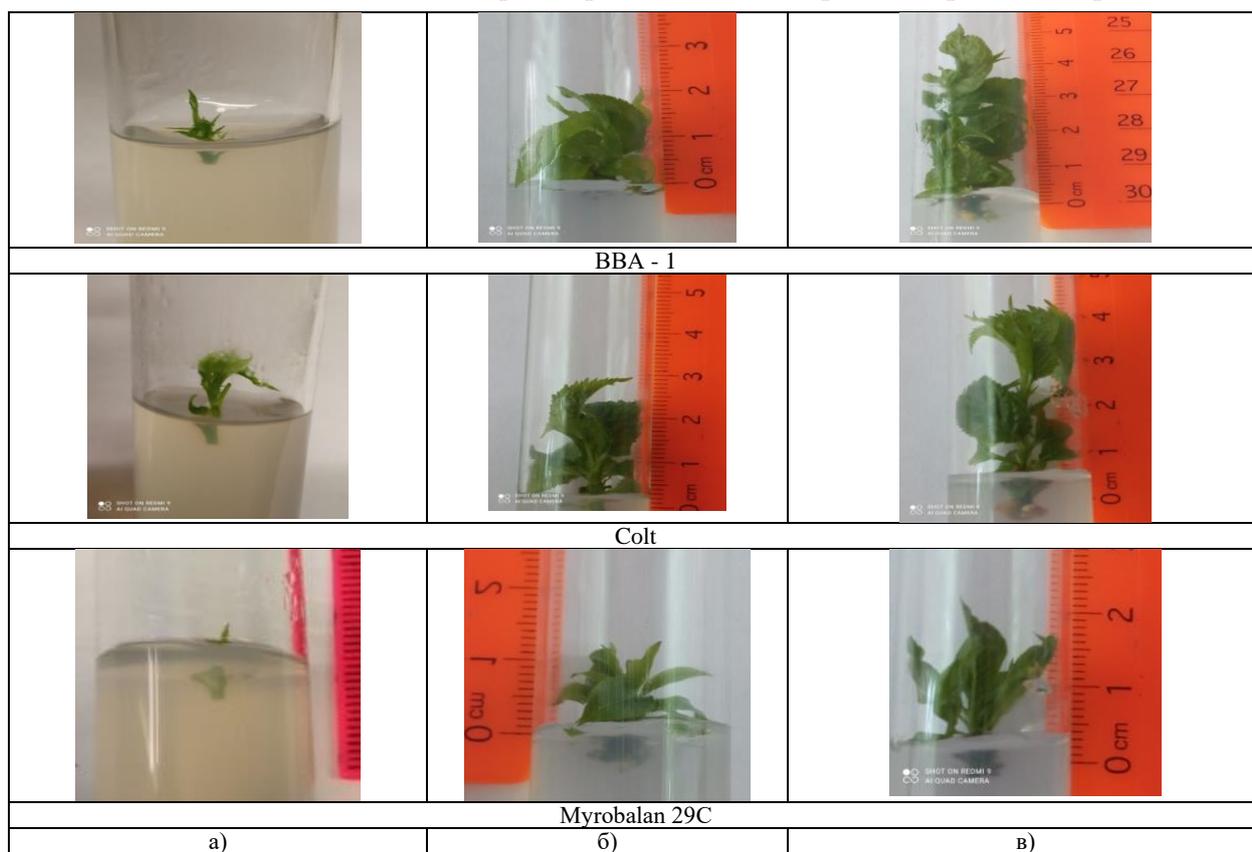


Рис. 2. Внешний вид развивающихся микропобегов клоновых подвоев:
а) в день пассажа; б) через 7 и в) через 14 дней развития

Размножение в культуре *in vitro* в течение 6 пассажей позволило установить, одинаковые (1,0) коэффициенты микроразмножения в первом пассаже для исследованных трех типов подвоев. Высокий коэффициент микроразмножения отмечен во втором пассаже для подвоя Colt (2,6), в третьем пассаже для подвоя Myrobalan 29C (3,0). Коэффициент микроразмножения микропобегов подвоя BBA-1 варьировал от 1,4 во втором и 1,6 в пятом пассаже. На шестом пассаже отмечено пожелтение и некроз, что отрицательно сказалось на развитии микропобегов подвоя BBA-1 (табл. 2).

Таблица 2. Результативность микроразмножения подвоев

Образец	Пассажи					
	I	II	III	IV	V	VI
BBA-1	1,0	1,4	1,4	1,4	1,6	-
Colt	1,0	2,6	1,3	1,8	2,3	2,1
Myrobalan 29C	1,0	2,8	1,6	3,0	2,4	1,9



Рис. 3. Развитие конгломератов микропобегов на этапе микроразмножения, развитие экспланта через 45 дней после ввода в культуру *in vitro* на 2 пассаже

Размноженные микробеги клоновых подвоев были помещены в условия хладохранения при температуре +5 – +8 °С, при полном отсутствии освещения на 78 дней. Затем в течение недели микробеги культивировали в условиях светокультуральной комнаты (рис. 4).

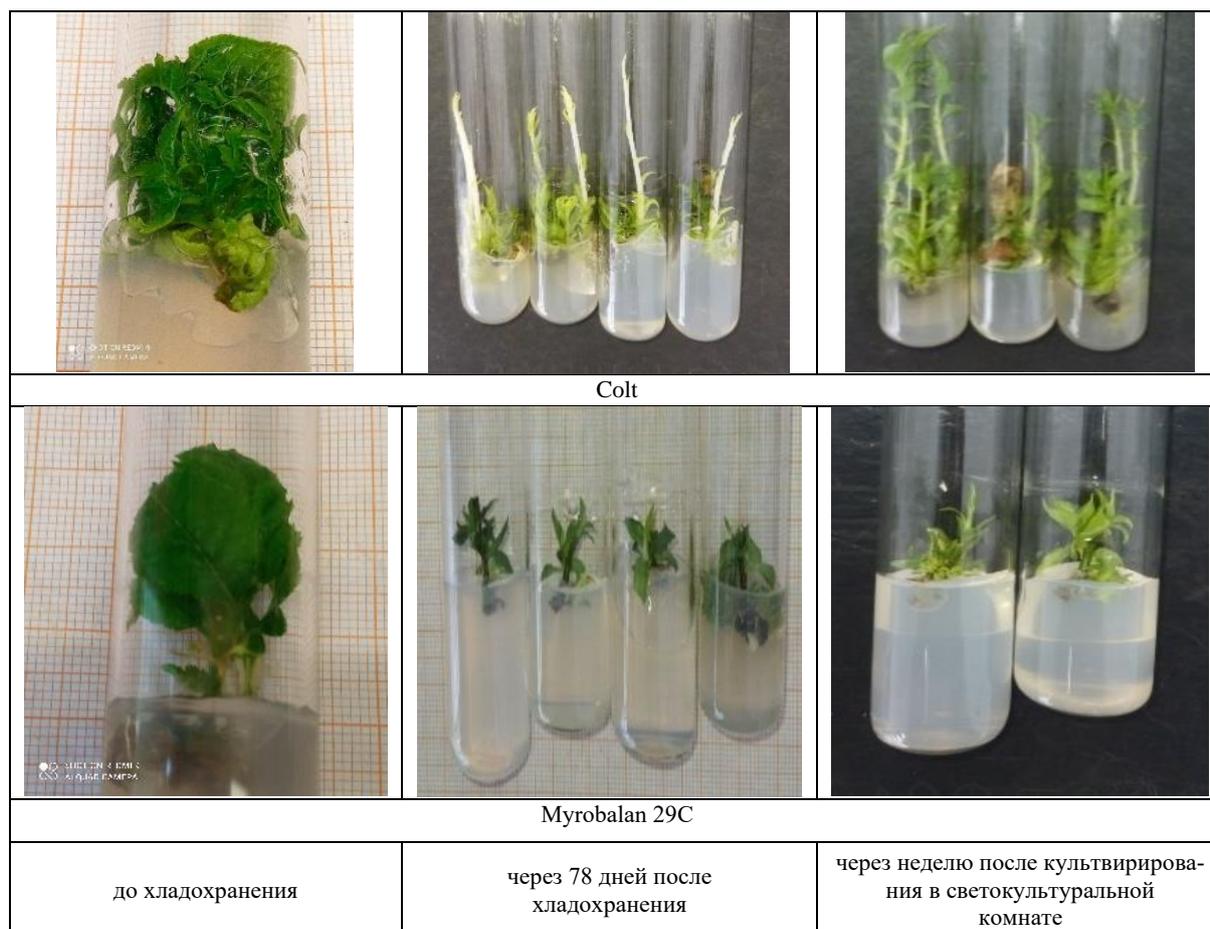


Рис. 4. Пробирочные растения подвоя Colt и Myrobalan 29С до и после депонирования при низких положительных температурах

Депонирование, проведенное для оценки возможности создания коллекции *in vitro*, показало разное количество образцов, выдержавших условия хладохранения, что, вероятно, связано с индивидуальными характеристиками подвоев (табл. 3–4).

Таблица 3. Результативность хладохранения подвоев

Образец	Количество пробирок					
	на хладохранение	после хладохранения				
		инфицированных	некрот	жизнеспособных		
шт	шт	шт	шт	%		
Colt	51	1	35	15	29,4	
Myrobalan 29С	15	-	11	4	26,7	

Таблица 4. Результативность микроразмножения подвоев после хладохранения

Образец	Коэффициент микроразмножения	
	I-пассаж	II-пассаж
Colt	3,3	5,6
Myrobalan 29С	8,0	3,7

Коэффициент микроразмножения микробега подвоев после хладохранения при низких положительных температурах и полном отсутствии освещения для подвоя Colt варьирует от 3,3 – в первом до 5,6 – во втором пассажах. Myrobalan 29С – 8,0 – в первом и 3,7 – во втором пассажах

Заключение

На этапе введения получены жизнеспособные экспланты 3 форм подвоев, эффективность инициации культуры *in vitro* при двухступенчатой стерилизации с использованием этанола и перекиси водорода составила 100 %.

Отмечена разная регенерационная способность в культуре *in vitro* на этапе микроразмножения эксплантов исследованных подвоев в течение шести пассажей. Установлены одинаковые (1,0) коэффициенты микроразмножения в первом пассаже для исследованных трех типов подвоев. Высокий коэффициент микроразмножения отмечен во втором пассаже для подвоя Colt (2,6), в третьем пассаже для подвоя Мугобалан 29С (3,0). Коэффициент микроразмножения микропобегов подвоя ВВА-1 варьировал от 1,4 во втором и 1,6 в пятом пассаже. На шестом пассаже отмечено пожелтение и некроз микропобегов подвоя ВВА-1.

Сохранность регенерантов подвоев Мугобалан 29С и Colt в результате депонирования низкая (29,4–26,7 %), однако достаточно высокие коэффициенты размножения (3,3–8,0) данных подвоев после хранения при низких температурах позволяют получать в дальнейшем посадочный материал.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Закон Республики Таджикистан о питомниководстве (Закон РТ от 20.04.2021г., №1779). – URL: https://ncz.tj/system/files/legislation/1669_ru.pdf (дата обращения: 3.09.2024).
2. Ancu Ș., Duțu I., și al. Vegetativ Rootstocks Recently Registered and Promising Selections of Stone Fruit Species.; Bulletin UASVM Horticulture, 66 (1) p.1-3, Pitești-Mărăcineni, 2009.
3. Семенные и клоновые подвой абрикоса и алычи. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/semennye-i-klonovye-podvoi-abrikosa-slivy-i-alychi/viewer> дата обращения: 3.09.2024).
4. Подвой сливы ВВА-1. – URL: <http://www.labff.ru/fruit> (дата обращения: 2.09.2024).
5. Охунджонов, А. Х. Засухоустойчивость подвоев абрикоса в условиях Северного Таджикистана / А. Х. Охунджонов, Д. Янгибаев, А. С. Фелалиев // Доклады АН РТ. – 2017. – Т. 60, №5–6. – С. 269–274.
6. Клоновые подвой черешни и вишни. – URL: <https://studfile.net/preview/8902695/page:5> (дата обращения 6.09.2024).
7. Совершенствование подвоев черешни – путь интенсификации культуры / В. Г. Мындра, А. М. Чернец, В. Т. Кожохаренко [и др.]. – URL: https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/31-34_26.pdf (дата обращения: 7.09.2024).
8. Murashige, T. A. revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15, iss. 3. – P. 473–497.
9. Размножение плодовых, ягодных растений, винограда и хмеля в культуре *in vitro* / Кухарчик Н. В. [и др.]; под общ. ред. Н. В. Кухарчик. – Минск: Колוגрад, 2021. – 400с.
10. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистич. обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. – 5-е изд., доп. и перераб. – М.: АГРОПромиздат, 1985. – 351 с.