
ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 634.71

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РАЗМНОЖЕНИЕ РЕМОУТАНТНОЙ ЕЖЕВИКИ *IN VITRO*

© Е. В. Немцова, А. И. Сенчилина, И. А. Разлуго
E. V. Nemtsova, A. I. Senchilina, I. A. Razlugo

The influence of plant growth regulators on the recurrent blackberry microclonal propagation

ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет имени академика И. Г. Петровского»
241036, Россия, г. Брянск, ул. Бежицкая, д. 14. Тел.: +7 (4832) 66-68-34, e-mail: elenanemz@mail.ru

Аннотация. В статье представлены результаты исследования влияния регулятора роста 6-БАП (6-бензиламинопурина) и аморфного диоксида кремния на клональное микроразмножение ремонтантной ежевики Прайм Арк Фридом и Рубен. Выявлено, что оптимальным для размножения мериклонов сорта Прайм-Арк Фридом является использование среды, содержащей 3 мг/л 6-БАП, сорта Рубен – 1,5 мг/л. При использовании безгормональной среды для культивирования мериклонов ежевики происходил интенсивный процесс корнеобразования. Выявлена тенденция к проявлению ростостимулирующего эффекта внесения 25–100 мг/л аморфного диоксида кремния в среду для культивирования мериклонов ежевики сорта Рубен. Длина побегов растений-регенерантов превышала показатель контрольных растений в 1,1 раза, коэффициент размножения – в 1,6 раза.

Ключевые слова: синтетический диоксид кремния, регуляторы роста растений, ремонтантная ежевика.

Abstract. The study represents the results of the influence of the plant growth regulator 6-BAP (6-benzylaminopurine) and the amorphous silica on the microclonal propagation of the recurrent blackberry (Prime Ark Freedom and Reuben cultivars). The optimum for the microclonal propagation of Prime Ark Freedom cultivar was the growth medium containing 3mg/l 6-BAP, Reuben cultivar – 1,5 mg/l 6-BAP. The application of the hormone-free culture medium for the blackberry microclonal propagation caused the intensive roots growth. It is revealed, that the use of multiplication media with 25–100 mg/g amorphous silica has a growth-stimulating effect on the recurrent blackberry mericlons of Reuben cultivar. The shoot length was 1,1 times more, the amount of shoots was 1,6 times more as compared to the control plants.

Keywords: synthetic amorphous silicon dioxide, plant growth regulators, recurrent blackberry.

DOI: 10.22281/2686-9713-2020-2-37-43

Введение

Ремонтантные формы ежевики способны плодоносить на однолетних побегах и давать два урожая за сезон: в середине июня и в начале осени. Культура является достаточно значимой – современный мировой ассортимент включает около 400 сортов, активно используются около 100 из них, в том числе на территории России – 40 сортов (Gryuner, Kuleshova, 2018).

Сорта ремонтантного типа обладают высокой урожайностью, крупноплодностью и широкой экологической пластичностью. Адаптивные возможности ежевики довольно высоки; многие сорта достаточно хорошо размножаются вегетативно. Некоторые ремонтантные формы ежевики обладают низким потенциалом вегетативного размножения по сравнению с летними сортами, что затрудняет их воспроизводство, а также селекционный процесс. Перспективным способом размножения ремонтантной ежевики, а также наиболее эффективным методом массового клонирования растений является культивирование их *in vitro*. Клональное микроразмножение позволяет получить большое количество мериклонов в относительно короткие сроки и на небольшом участке. Эта технология разработана и успешно применяется для получения свободного от патогенов посадочного материала ежевики (Skovorodnikov et al., 2015).

Рост и развитие растений, выращиваемых в культуре тканей, регулируют вещества, образуемые самим растением – эндогенные фитогормоны. При культивировании растений *in vitro* в состав питательной среды включают регуляторы роста, благотворно влияющие на состояние растений-регенерантов, их коэффициент размножения, интенсивность роста, укореняемость и другие параметры. Синтетические регуляторы роста проявляют свое действие путем изменения эндогенного уровня природных гормонов, позволяя таким образом влиять на рост и развитие растений в культуре *in vitro* в желаемом направлении (Vysotskiy, Uradyshev, 1992).

При культивировании *in vitro* растений рода *Rubus* используются цитокинины, например, аденин, кинетин, 6-бензиламинопуриин (6-БАП), зеатин и др. Они применяются в концентрациях от 1 до 10 мг/л и индуцируют процесс деления клеток и образования боковых побегов, подавляя при этом развитие корней. При укоренении ягодных культур рода *Rubus* чаще всего используют ауксины в концентрации 0,1–1,0 мг/л. При меньших концентрациях отмечается низкий процент укоренения; более высокие концентрации способствуют сильному каллусообразованию в зоне ризогенеза (Nam et al., 1998).

К числу компонентов, обладающих ростостимулирующим эффектом в культуре *in vitro*, относят аморфный диоксид кремния. Его использование при клональном микроразмножении растений ещё недостаточно изучено, но есть сведения о том, что он вовлечён в процесс снижения уровня стресса у растений, а также повышает адаптивный потенциал организма (Datnoff et al., 2001). Установлено, что соединения кремния нужны растениям для формирования и поддержания иммунитета, что обусловлено потребностью растений в кремнии на генетическом уровне (Takahashi, Ma, 1991).

Очевидно несоответствие между значимостью кремния для растений и объёмом имеющихся о его роли знаний. Многие теоретические и практические вопросы, касающиеся полифункциональной роли кремния в растениях и почвах, остаются малоизученными (Matychenkov et al., 2008). Актуальность представляет изучение влияния соединений кремния на растения ремонтантной ежевики и других ягодных и декоративных растений, культивируемых *in vitro*.

Цель данной работы – оптимизировать условия клонального микроразмножения ремонтантной ежевики с использованием питательных сред, содержащих аморфный диоксид кремния и синтетические регуляторы роста растений.

Методика исследования

Работа выполнена в лаборатории ИННО-центра биотехнологии и экологии Брянского государственного университета им. академика И. Г. Петровского в 2019–2020 гг.

Изучение влияния регулятора роста 6-БАП и аморфного диоксида кремния на морфометрические показатели, коэффициент размножения и укореняемость растений ремонтантной ежевики различных сортов проводилось с использованием мериклонов сортов Рубен и Прайм Арк Фридом.

Культивирование растений-регенерантов ремонтантной ежевики *in vitro* осуществлялось на среде Мурасиге-Скуга (MS) с 3% сахарозой и 0,7% агаром, pH = 5,8 (Murashige, Skoog, 1962). Для выполнения поставленных задач проводили следующие эксперименты.

1. Изучение влияния 6-БАП на размножение ремонтантной ежевики в культуре *in vitro*.

Черенки растений-регенерантов изучаемых сортов переносили на стерильную питательную среду MS согласно схеме: контроль – безгормональная среда; опыт – среда MS, содержащая 0,5 мг/л 6-БАП, 1,5 мг/л 6-БАП, 3 мг/л 6-БАП.

Побеги растений-регенерантов, размножаемых *in vitro*, отделяли от первичного эксплантата, делили на черенки и переносили на питательную среду. Культивирование микропобегов осуществляли при 25°C под лампами дневного света при 16-часовом фотопериоде. Длительность субкультивирования составляла 8 недель. Определяли морфометрические показатели – коэффициент размножения, длину побега и корня, число корней. Статистическую обработку проводили в среде MS Excel 2010.

2. Изучение влияния аморфного диоксида кремния на морфометрические показатели и коэффициент размножения ремонтантной ежевики в культуре *in vitro*.

В питательную среду MS перед автоклавированием вносили аморфный кремнезём в количестве 25, 50, 100 мг/л (в пересчёте на диоксид кремния). Регулятор роста 6-БАП (0,5 мг/л) вносили в стерильную питательную среду перед черенкованием растений. Готовую среду разливали в стерильные сосуды. Варианты опыта: контроль – среда MS; опыт – среда MS, содержащая 25, 50 и 100 мг/л аморфного кремнезёма. Микропобеги исследуемых растений ремонтантной ежевики переносили на питательную среду и осуществляли культивирование в условиях, указанных в эксперименте 1.

В ходе работы был использован синтетический аморфный диоксид кремния «Ковелос», производимый ООО «Экокремний». Препарат «Ковелос» – порошок с размером частиц от 6 до 40 микрон, белого цвета с нанопористой структурой частиц, с ярко выраженными сорбционными свойствами. Массовая доля кремния в препарате составляет не менее 99% по массе.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования изучено влияние синтетического аморфного диоксида кремния и регулятора роста цитокининовой природы 6-БАП на морфометрические показатели микропобегов ремонтантной ежевики сортов Рубен и Прайм Арк Фридом, размножаемых в культуре *in vitro*.

Влияние 6-БАП на морфометрические показатели ремонтантной ежевики в культуре *in vitro*. Изучено влияние 6-БАП в концентрациях 0,5, 1,5 и 3 мг/л на коэффициент размножения и длину побегов растений-регенерантов ремонтантной ежевики. Результаты опыта представлены в табл. 1, 2 и на рис.

Таблица 1
Влияние 6-БАП на размножение ремонтантной ежевики сорта Прайм-Арк Фридом (* – отличия достоверны при $p \leq 0,05$)

Table 1
The influence of 6-BAP on the microclonal propagation of the recurrent blackberry, Prime Ark Freedom cv.
(*statistically significant difference at $p \leq 0,05$)

Вариант	Коэффициент размножения, шт	Длина побега, мм	Число корней, шт	Длина корней, мм
Контроль	1,00±0,00	23,08±2,33	1,90±0,35	21,90±3,51
0,5 мг/л 6-БАП	3,50±0,09*	11,79±0,57*	–	–
1,5 мг/л 6-БАП	3,67±0,35*	10,22±0,42*	–	–
3 мг/л 6-БАП	4,80±0,69*	8,89±0,42*	–	–

Таблица 2
Влияние 6-БАП на размножение ремонтантной ежевики сорта Рубен (* – отличия достоверны при $p \leq 0,05$)

The influence of 6-BAP on the microclonal propagation of the recurrent blackberry, Reuben cv.
(*statistically significant difference at $p \leq 0,05$)

Вариант	Коэффициент размножения, шт	Длина побега, мм	Число корней, шт	Длина корней, мм
Контроль	1,00±0,00	39,50±3,90	3,00±0,46	61,00±5,60
0,5 мг/л 6-БАП	3,60±0,42*	8,80±0,45*	–	–
1,5 мг/л 6-БАП	4,07±0,47*	9,23±0,33*	–	–
3 мг/л 6-БАП	3,17±0,32*	8,34±0,43*	–	–

Из данных табл. 1 и 2 следует, что введение в питательную среду стимулятора цитокининовой природы 6-БАП обладало достоверным влиянием на параметры роста растений-регенерантов ремонтантной ежевики. Внесение в среду 0,5 мг/л 6-БАП приводило к увеличению коэффициента размножения растений ежевики Прайм-Арк Фридом в 3,5 раза (табл. 1). Использование данного регулятора роста в концентрации 3 мг/л увеличивало коэффициент размножения ежевики данного сорта в 4,8 раза по сравнению с контрольным вариантом, которым служила безгормональная среда. Коэффициент размножения растений-регенерантов ежевики Прайм-Арк Фридом при использовании 3 мг/л 6-БАП являлся максимальным и составил 4,80±0,69 шт.

Увеличение коэффициента размножения приводило к увеличению числа мериклонов в конгломерате и уменьшению длины побегов. Растения ежевики Прайм-Арк Фридом, культивируемые на среде, содержащей 6-БАП, характеризовались 2-х кратным уменьшением длины побега, по сравнению с контролем. Длина побегов растений контрольного варианта составила $23,08 \pm 2,33$ мм, а при использовании 0,5 мг/л 6-БАП – $11,79 \pm 0,57$ (отличия достоверны при $p \leq 0,05$). Уменьшение длины побегов при увеличении их общего количества в конгломерате обусловлено недостаточным количеством питательных веществ для накопления биомассы.

При использовании для культивирования мериклонов ежевики Прайм-Арк Фридом безгормональной среды, не содержащей стимуляторов роста, размножения растений не происходило. Микропобеги интенсивно росли и образовывали корни, среднее число которых составляло $1,90 \pm 0,35$. Длина корней у растений контрольного варианта составляла $21,90 \pm 3,51$ мм. При культивировании растений на среде, содержащей цитокинин 6-БАП, корнеобразования не происходило. Это связано с тем, что удаление цитокининов из питательной среды приводит к выработке эндогенных ауксинов и активизации корнеобразования у растений-регенерантов, культивируемых на безгормональных средах.

Результаты изучения влияния 6-БАП на клональное микроразмножение ежевики сорта Рубен отображены в табл. 2, рис. Внесение в среду 0,5–3 мг/л 6-БАП приводило к увеличению коэффициента размножения ежевики Рубен в 3–4 раза, по сравнению с контролем (отличия достоверны при $p \leq 0,05$). К максимальному увеличению коэффициента размножения приводило использование среды, содержащей 6-БАП в количестве 1,5 мг/л – показатель увеличился в 4 раза, по сравнению с контрольным вариантом, и составил $4,07 \pm 0,47$ шт.

Увеличение коэффициента размножения также приводило к уменьшению длины побегов ежевики Рубен. Мериклоны, культивируемые на среде, содержащей 6-БАП, характеризовались значительным уменьшением длины побега по сравнению с контролем. Длина побегов растений контрольного варианта составила $39,50 \pm 3,90$ мм, что в 4,3–4,8 раза больше, чем при использовании среды, содержащей цитокинин. При внесении 3 мг/л 6-БАП коэффициент размножения являлся достаточно высоким, а длина побегов минимальной и составила $8,34 \pm 0,43$ мм (отличия достоверны при $p \leq 0,05$).

При использовании для культивирования ежевики Рубен безгормональной среды, не содержащей стимуляторов роста, размножения растений не происходило. Микропобеги образовывали корни, число которых составляло $3,00 \pm 0,46$ шт. Длина корней у растений контрольного варианта составляла $61,00 \pm 5,60$ мм.



Рис. Влияние 6-БАП на размножение ремонтантной ежевики сорта Рубен: К. – контроль, 1 – 0,5 мг/л 6-БАП, 2 – 1,5 мг/л 6-БАП, 3 – 3 мг/л 6-БАП.

Fig. The influence of 6-BAP on the microclonal propagation of the recurrent blackberry, Reuben cv.: K. – control, 1 – 0,5 mg/l 6-BAP, 2 – 1,5 mg/l 6-BAP, 3 – 3 mg/l 6-BAP.

Влияние аморфного диоксида кремния на морфометрические показатели ремонтантной ежевики в культуре *in vitro*. Для изучения влияния аморфного диоксида кремния на коэффициент размножения и длину побегов растений-регенерантов ремонтантной ежевики использовали питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую аморфный кремнезём «Ковелос» в количестве 25, 50, 100 мг/л. Результаты опыта представлены в табл. 3, 4.

При использовании аморфного диоксида кремния «Ковелос» наблюдалась тенденция к уменьшению длины побега и коэффициента размножения растений ежевики сорта Прайм-Арк Фридом (данные представлены в табл. 3). Коэффициент размножения растений контрольного варианта был максимален и составлял $6,14 \pm 1,16$ шт. Мериклоны контрольного варианта также характеризовались максимальной длиной, которая составила $11,74 \pm 1,04$ мм. Требуется дальнейшее изучение влияния аморфного кремнезёма на клональное микроразмножение ежевики Прайм-Арк Фридом в других концентрациях.

Таблица 3

Влияние аморфного диоксида кремния «Ковелос»
на размножение ремонтантной ежевики сорта Прайм-Арк Фридом

Table 3

The influence of the amorphous silica «Kovelos»
on the microclonal propagation of the recurrent blackberry, Prime Ark Freedom cv.

Вариант, содержание аморфного диоксида кремния	Коэффициент размножения, шт	Длина побега, мм
контроль	$6,14 \pm 1,16$	$11,74 \pm 1,04$
25 мг/г	$4,89 \pm 0,90$	$7,98 \pm 0,58$
50 мг/г	$4,71 \pm 0,26$	$7,94 \pm 0,79$
100 мг/г	$5,29 \pm 0,20$	$7,92 \pm 0,74$

Наблюдалась тенденция к проявлению ростостимулирующего эффекта внесения аморфного диоксида кремния в среду для культивирования мериклонов ежевики сорта Рубен (табл. 4). Коэффициент размножения растений данного сорта был максимален на среде, содержащей 50 мг/г аморфного кремнезёма, и составил $6,77 \pm 1,17$ шт., что в 1,6 раза больше по сравнению с контролем. Коэффициент размножения растений, культивируемых на среде без добавления аморфного кремнезёма, составил $4,25 \pm 0,84$ шт.

Таблица 4

Влияние аморфного диоксида кремния «Ковелос»
на размножение ремонтантной ежевики сорта Рубен

Table 4

The influence of the amorphous silica «Kovelos»
on the microclonal propagation of the recurrent blackberry, Reuben cv.

Вариант, содержание аморфного диоксида кремния	Коэффициент размножения, шт	Длина побега, мм
контроль	$4,25 \pm 0,84$	$7,47 \pm 0,75$
25 мг/л	$6,42 \pm 1,41$	$8,29 \pm 0,49$
50 мг/л	$6,77 \pm 1,17$	$8,07 \pm 0,40$
100 мг/л	$6,38 \pm 1,02$	$7,24 \pm 0,40$

Длина побегов ежевики сорта Рубен, культивируемых с использованием кремнезёмсодержащих сред, содержащих диоксид кремния в количестве 25-50 мг/л, превышала аналогичный показатель растений контрольного варианта. Наибольшим средним значением характеризовались растения, культивируемые на среде, содержащей 25 мг/л аморфного кремнезёма – показатель составил $8,29 \pm 0,49$ мм. Средняя длина растений контрольного варианта – $7,47 \pm 0,75$ мм.

Заключение

По результатам изучения влияния регулятора роста цитокининовой природы 6-БАП на культивирование мериклонов ремонтантной ежевики *in vitro*, оптимальным количеством для размножения ежевики ежевики сорта Прайм-Арк Фридом являлось использование питательной среды MS, содержащей 3 мг/л 6-БАП, сорта Рубен – 1,5 мг/л 6-БАП.

При использовании безгормональной среды для культивирования мериклонов ремонтантной ежевики указанных сортов происходил интенсивный процесс корнеобразования.

Выявлена тенденция к проявлению ростостимулирующего эффекта внесения 25–50 мг/л аморфного диоксида кремния в питательную среду для культивирования мериклонов ремонтантой ежевики сорта Рубен. При использовании среды, содержащей 50 мг/л аморфного кремнезёма, коэффициент размножения превышал показатель контрольного варианта в 1,5 раза.

Результаты исследования могут быть использованы для создания технологии применения аморфного диоксида кремния в качестве регулятора роста растений. Такие препараты могут быть использованы в сельском хозяйстве, растениеводстве и при культивировании растений *in vitro*.

Список литературы

Datnoff L. E., Snyder G. H., Korndörfer G. H. 2011. Silicon in agriculture. studies in plant science. 8. Amsterdam: Elsevier. 424 p.

[Gryuner, Kuleshova] Грюнер Л. А., Кулешова О. В. 2018. Актуальные направления селекции и новые элитные формы ежевики генофонда ВНИИСПК // Современное садоводство. № 3 (27). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/aktualnye-napravleniya-selektcii-i-novye-elitnye-formy-ezheviki-genofonda-vniispk>. Дата обращения: 17.03.2020.

[Matychenkov et al.] Матыченков В. В., Бочарникова Е. А., Кособрюхов А. А., Биль К. Я. 2008. О подвижных формах кремния в растениях // Докл. РАН. № 418 (2). С. 279–281.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. Vol. 15. N 3. P. 473–497.

[Nam et al.] Нам И. Я., Заякин В. В., Вовк В. В., Казаков И. В. 1998. Оптимизация метода клонального микроразмножения для ускоренной селекции межвидовых ремонтантных форм малины // Сельскохозяйств. биол. № 3. С. 51–55.

[Skovorodnikov et al.] Сковородников Д. Н., Милехина Н. В., Орлова Ю. Н. 2015. Особенности клонального микроразмножения ежевики и малино-ежевичных гибридов // Вестник Брянского гос. Ун-та. Сер.: Точные и естественные науки. № 3. С. 417–419.

Takahashi E., Ma J. F. 1991. The possibility of silicon as an essential element for higher plants // Com. Agric. And Food Chem. V. 2. N 3. P. 188–194.

[Vysotskiy, Upadyshev] Высокый В. А., Упадышев М. Т. 1992. Регенерация вегетативных органов листовыми дисками и другими эксплантатами рода *Rubus in vitro* // Физиология растений. Т. 39. Вып. 3. С. 584–590.

References

Datnoff L. E., Snyder G. H., Korndörfer G. H. 2011. Silicon in agriculture. studies in plant science. 8. Amsterdam: Elsevier. 424 p.

Gruner L. A., Kuleshova O. V. 2018. Current trends in breeding and new elite forms of blackberry gene pool VNIISPK // Modern gardening. N 3 (27). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/aktualnye-napravleniya-selektcii-i-novye-elitnye-formy-ezheviki-genofonda-vniispk>. Date of access: 03.17.2020. (In Russian)

Matychenkov V. V., Bocharnikova E. A., Kosobryukhov A. A., Bill K. Ya. 2008. On mobile forms of silicon in plants // Reports of the RAS. N 418 (2). P. 279–281. (In Russian)

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. Vol. 15. N 3. P. 473–497.

Nam I. Ya., Zayakin V. V., Vovk V. V., Kazakov I. V. 1998. Optimizatsiia metoda klonalnogo mikrorazmnozheniia dlia uskorennoi selektcii mezvidovykh remontantnykh form maliny [Optimization of the clonal micropropagation method for accelerated selection of interspecific repairing forms of raspberries] // Sel'skokhoz. biol. [Agriculture biol.]. N. 3. P. 51–55. (In Russian).

Skovorodnikov D. N., Milekhina N. V., Orlova Yu. N. 2015. Features of clonal micropropagation of blackberries and raspberry-blackberry hybrids // Herald of the Bryansk State University. Ser.: Exact and natural sciences. N. 3. P. 417–419. (In Russian)

Takahashi E., Ma J. F. 1991. The possibility of silicon as an essential element for higher plants // Com. Agric. And Food Chem. V. 2. N 3. P. 188–194.

Vysotsky V. A., Upadyshev M. T. 1992. Regeneratsiia vegetativnykh organov listovymi diskami i drugimi eksplantami roda *Rubus in vitro* [Regeneration of vegetative organs by leaf discs and other explants of the genus *Rubus in vitro*] // Fiziologiya rastenii [Plant Physiology]. T. 39. Issue. 3. P. 584–590. (In Russian)

Сведения об авторах

Немцова Елена Валентиновна

к. б. н., доцент кафедры биологии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: elenanemz@mail.ru

Сенчилина Анастасия Игоревна

Студентка естественно-географического факультета
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: anastasiya_senchilina@mail.ru

Разлуго Ирина Алексеевна

Магистрант кафедры биологии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
имени академика И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: irina.razlugo@yandex.ru

Nemtsova Elena Valentinovna

Ph. D. in Biological Sciences, Ass. Professor of the Dpt. of Biology
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: elenanemz@mail.ru

Senchilina Anastasia Igorevna

Undergraduate Student of the Faculty of Natural Sciences
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: anastasiya_senchilina@mail.ru

Razlugo Irina Alekseevna

Postgraduate Student of the Dpt. of Biology
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: irina.razlugo@yandex.ru