

***«ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ
СОРТОВ МАЛИНЫ»***



**Патрин Александр Александрович
РУКОВОДИТЕЛЬ ВКР: Пугачева Г.М.**



Цель исследований - оптимизировать методику клонального микроразмножения перспективных сортов малины.

Задачи:

- 1. Изучить характеристику сортов малины. Отобрать генотипы с высокими продуктивными признаками наиболее пригодные для массового производства посадочного материала.**
- 2. Изучить влияние минерального, гормонального и углеводного состава питательных сред на этапе введения и размножения побегов изучаемых сортов малины.**
- 3. Изучить влияние типа и концентрации ауксина с применением стимулирующих факторов на эффективность ризогенеза сортов малины.**
- 4. Оценить эффективность размножения и укоренения *in vitro* взятых в систему размножения сортов.**
- 5. Отработать методику перехода микрорастений в естественные условия среды с минимальными потерями.**
- 6. Рассчитать экономическую эффективность результатов исследований.**

Исследования проведены в учебно-исследовательской лаборатории биотехнологии ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ.



ГЕРАКЛ



ОРАНЖЕВОЕ ЧУДО



METEOP



ВОЛЬНИЦА



Методика опытов

В работе придерживались общепринятых при работе с культурой тканей растений методик приготовления и стерилизации питательных сред, инструментов и оборудования .

Для культивирования растений *in vitro* использовали минеральную основу питательных сред Мурасиге–Скуга, WPM, Кворина–Лепуавра, дополненную мезоинозитолом – 100 мг/л, агаром – 6-7 г/л и комплексом витаминов по прописи Мурасиге-Скуга. В качестве источника углевода в среду вносили сахарозу, глюкозу, фруктозу, мальтозу в концентрации 10-40 г/л. Применяли регуляторы роста растений: 6-бензиламинопури́н (6-БАП) и зеатин - 0,5-2,0 мг/л и ауксины: β-индолил-3-масляную кислоту (ИМК) или β-индолилуксусную кислоту (ИУК) - 0,05-0,2 мг/л.

Побеги, достигшие на среде размножения длины 1,5-2,0 см срезали и использовали для укоренения. На этапе укоренения микрочеренков концентрацию макросолей и углевода снижали вдвое, использовали безгормональные питательные среды или в среду укоренения добавляли β-индолилмасляную кислоту (ИМК) и β-индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,1-1,0 мг/л.

Все эксперименты проводились в трехкратной повторности по десять эксплантов в повторении.

Коэффициент размножения определяли как отношение общего числа вновь образовавшихся побегов за пассаж к числу эксплантов, образовавших, по крайней мере, один дополнительный побег.

Среднее число корней определяли как отношение числа образовавшихся корней к числу побегов, образовавших, по крайней мере, один корень.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Таблица 1. Выход стерильных эксплантов сортов малины при разных способах и сроках введения в культуру, %

Сорт	Способ введения	Срок посадки экспланта, месяц	
		март	июнь
<u>Вольница</u>	Сегмент зеленого побега	83,3	60,0
	Распускающиеся почки	75,0	43,9
Метеор	Сегмент зеленого побега	87,2	65,4
	Распускающиеся почки	63,2	42,6
Геракл	Сегмент зеленого побега	78,5	65,3
	Распускающиеся почки	62,6	56,8
Оранжевое чудо	Сегмент зеленого побега	90,3	71,3
	Распускающиеся почки	73,2	62,1

Таблица 2. Результативность стерилизации эксплантов при введении в культуру in vitro ремонтантной малины

Стерилизующий агент	Эффективность стерилизации, %	Сорт			
		Оранжевое чудо	Метеор	Вольница	Геракл
HgJ ₂	Жизнеспособные	58,9	72,2	69,6	71,5
	Инфицированные	5,8	0,0	0,0	0,0
	Некроз	35,3	27,8	30,4	28,5
«Белизна» 1:1	Жизнеспособные	64,2	80,7	60,4	62,3
	Инфицированные	2,5	0,0	3,4	2,7
	Некроз	35,8	19,3	25,1	30,7
«Белизна» 1:2	Жизнеспособные	77,8	79,6	77,6	79,7
	Инфицированные	8,4	6,8	6,5	7,2
	Некроз	14,0	13,6	13,1	15,7
«Белизна» 1:4	Жизнеспособные	52,0	54,0	56,3	53,2
	Инфицированные	37,7	36,7	39,2	40,3
	Некроз	10,3	9,3	8,5	8,1

Таблица 3. Влияние минерального состава питательной среды на эффективность клонального микроразмножения сортов малины обыкновенной

Сорт	Коэффициент размножения на среде		
	QL	MS	WPM
Геракл	3,0±0,2	3,4±0,2	2,7±0,2
Вольница	3,2±0,2	4,1±0,3	2,5±0,2
Оранжевое чудо	3,6±0,3	4,3±0,2	3,0±0,2
Метеор	2,9±0,2	3,7±0,1	1,9±0,1



Рисунок 1. Размножение малины (сорт Вольница) на среде WPM (слева) и среде MS (справа) при содержании 6-БАП 0,5 мг/л

Таблица 4. Влияние минерального состава питательной среды на рост побегов малины в культуре *in vitro*

Сорт	Длина побегов, см		
	QL	MS	WPM
Геракл	3,4±0,3	3,6±0,2	2,5±0,2
Вольница	3,6±0,3	3,8±0,2	2,7±0,1
Оранжевое чудо	4,2±0,3	3,3±0,3	3,0±0,2
Метеор	4,4±0,2	4,0±0,3	2,4±0,2

Таблица 5. Влияние различных цитокининов на количество образовавшихся побегов малины

Сорт	Концентрация цитокинина, мг/л							
	6-БАП 0,1	6-БАП 0,5	6-БАП 1,0	6-БАП 2,0	Зеатин 0,1	Зеатин 0,5	Зеатин 1,0	Зеатин 2,0
Метеор	1,2±0,2	1,4±0,1	2,5±0,3	1,6±0,2	1,2±0,3	1,3±0,1	2,5±0,1	2,4±0,8
Геракл	1,0±0,2	2,2±0,3	2,8±0,5	1,3±0,2	1,3±0,2	1,2±0,1	1,3±0,2	1,7±0,2
Вольница	1,3±0,2	1,5±0,1	3,0±0,2	2,1±0,1	1,3±0,1	1,8±0,1	2,8±0,3	1,1±0,1
Оранжевое чудо	1,2±0,1	1,6±0,2	2,7±0,2	1,2±0,2	1,4±0,2	1,1±0,2	2,0±0,2	1,2±0,3

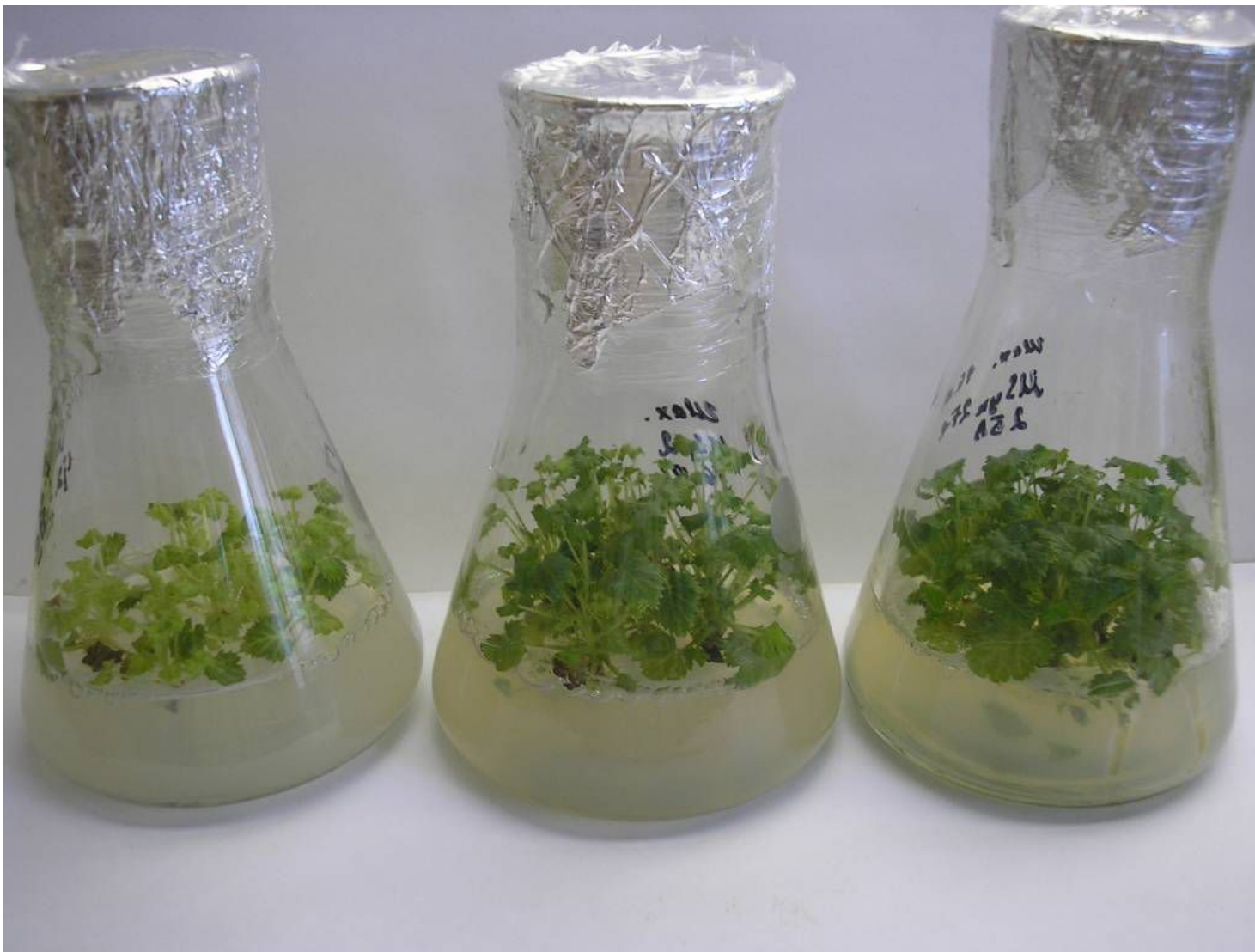


Рисунок 2. Размножение малины ремонтантной на среде 1/2MS, MS, MS с 2Fe (слева-направо)

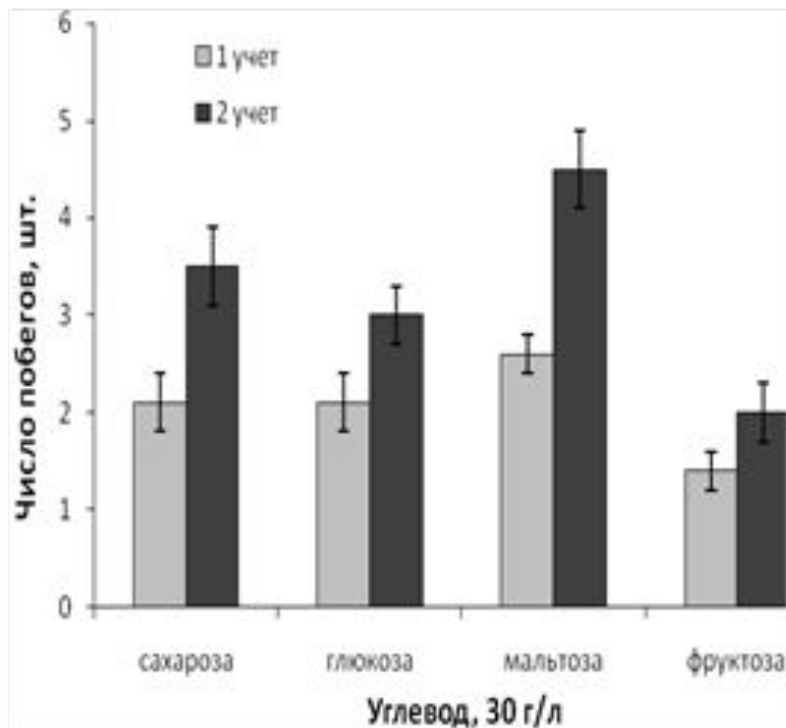


Рисунок 3. Коэффициент размножения малины обыкновенной (сорт Вольница) на среде MS с разными углеводами

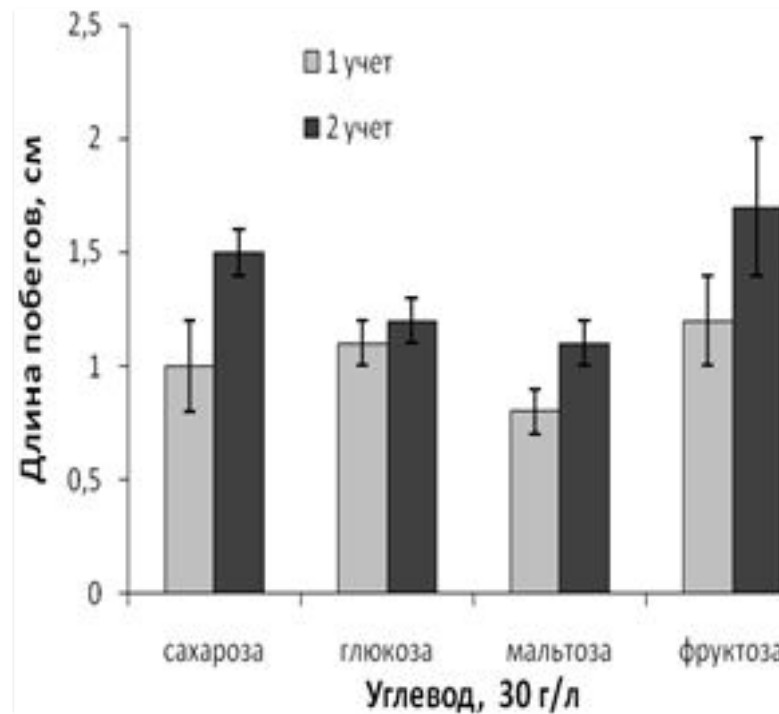
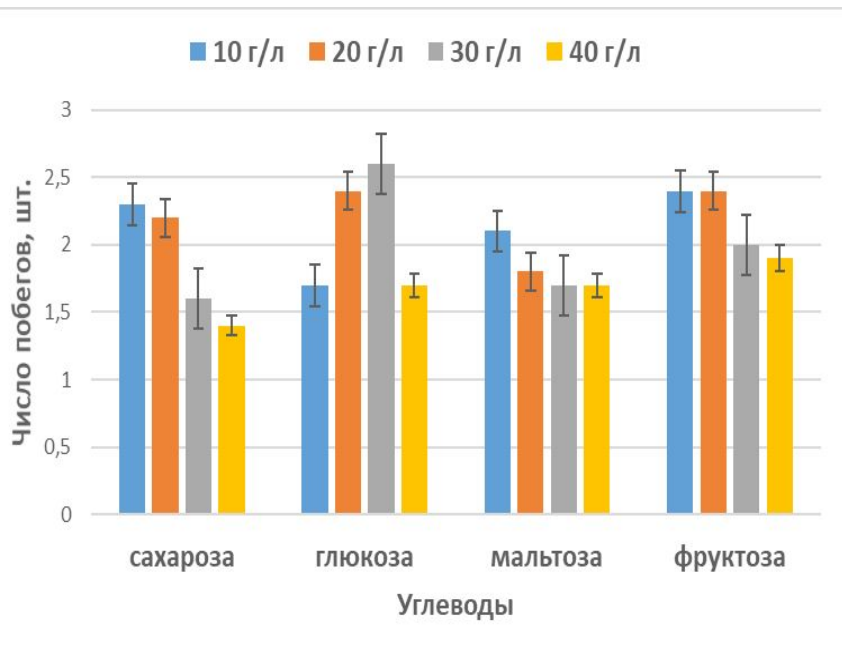


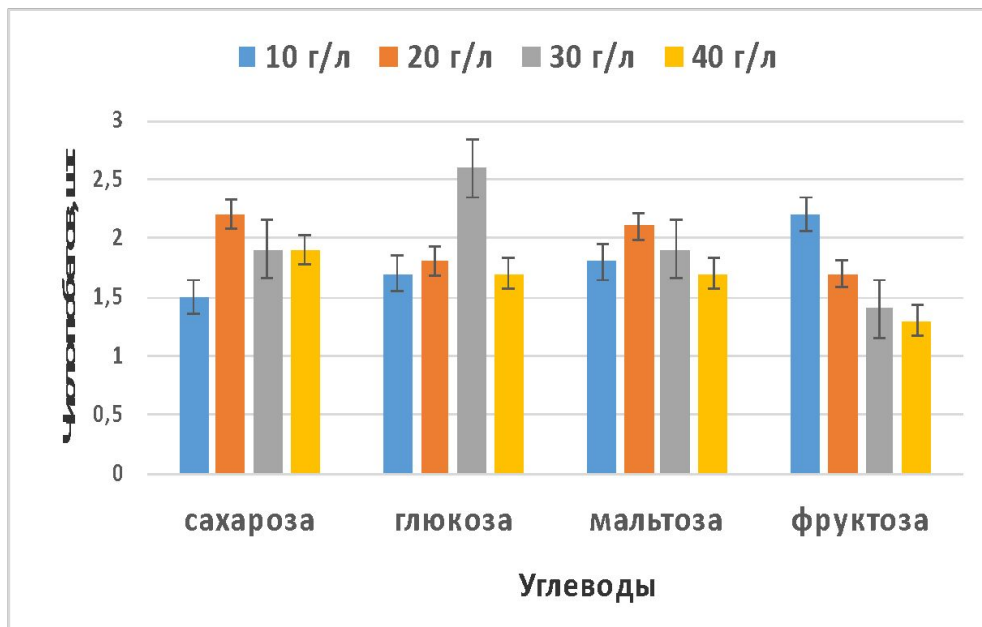
Рисунок 4. Прирост побегов малины обыкновенной (сорт Вольница) на среде MS с разными углеводами



Рисунок 5. Размножение малины сорт Оранжевое чудо на среде MS с добавлением сахарозы



а



б

Рисунок 6. Размножение малины на средах с разными углеводами: а - сорт Геракл, б – сорт Метеор



Рисунок 6. Развитие корневой системы у малины Оранжевое чудо на среде MS слева - контроль без гормонов, справа - ИМК – 0, 25 мг/л

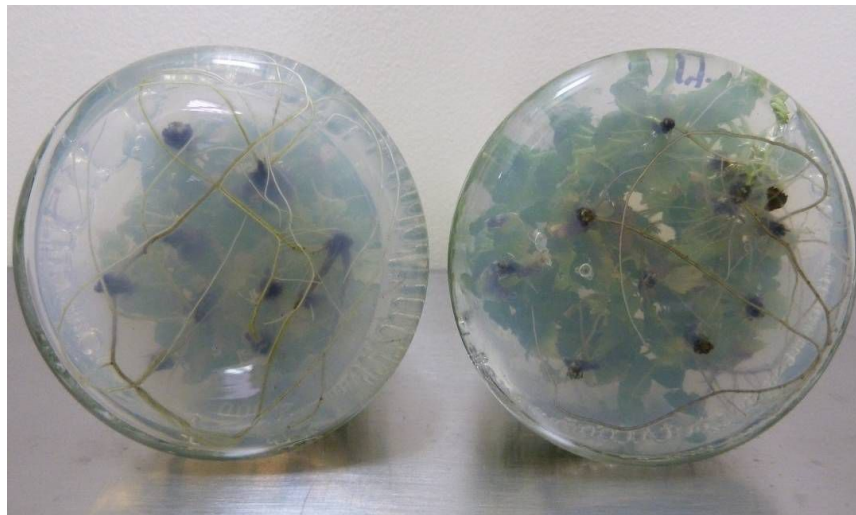
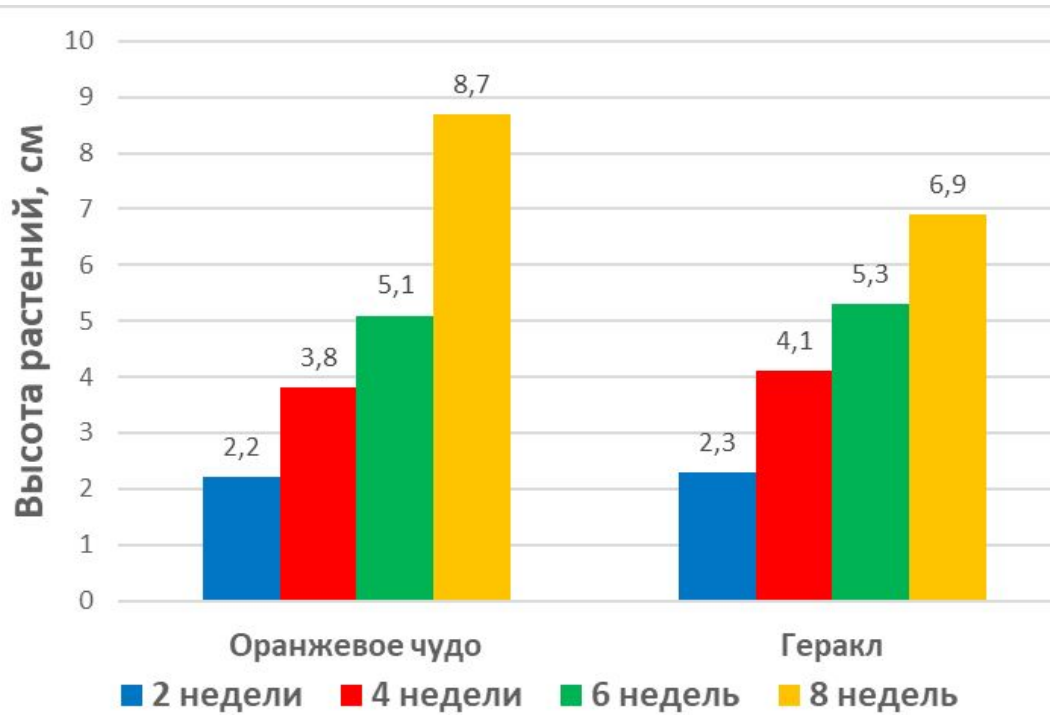


Рисунок 7. Развитие корневой системы у малины Оранжевое чудо на среде MS слева - ИМК – 1,0 мг/л, справа - 1,0 мг/л ИУК



а

б

Рисунок 8. Динамика роста адаптированных растений малины (а), сорт малины Геракл на адаптации (б)

Таблица 6. Экономическая эффективность выращивания малины

Показатели	Растение	
	кассетное	горшечное
Затраты на 1 тыс штук, тыс. руб.	15,76	38,08
Себестоимость 1 растения, руб.	15,76	38,08
Средняя цена реализации, руб.	37,5	90
Выручка, тыс. руб.	37,5	90,0
Чистый доход с 1 тыс. растений, тыс. руб.	21,74	51,920
Уровень рентабельности, %	137,9	136,3

ВЫВОДЫ

1. Введение в стерильную культуру сортов малины ремонтантной лучше проводить в марте при использовании в качестве эксплантов проросших при комнатной температуре почек.

2. Для стерилизации растительного материала сортов малины эффективно применение препарата «Белизна» в разведении 1:2. Доля жизнеспособных эксплантов составила 78,7%; от изначально высаженных.

3. Процент свободных от контаминаций эксплантов при ранневесеннем сроке введения выше, чем при раннелетнем сроке введения. Эффективность освобождения эксплантов от инфекции при весеннем сроке введения в культуру *in vitro* составила 78,5–90,3 % и при летнем - 42,6 - 62,1 %.

4. Для роста и развития растений малины изученных сортов лучше использовать среду Мурасиге-Скуга, на которой отмечены наибольший коэффициент размножения и увеличение длины побегов.

5. Для размножения ремонтантной малины эффективней всего использовать питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962) дополненную 1,0 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л ГК и двойной концентрацией хелата железа.

5. При повышенном содержании железа у малины формируются хорошо развитые побеги с крупными листьями темно-зеленого цвета, тогда как при пониженной по отношению к контролю (стандартная среда MS) концентрации железа формируются укороченные побеги с бледно-зелеными или желтоватыми листьями. Дальнейшее повышение концентрации хелата железа в среде не эффективно, так как на средах с тройным содержанием железа побеги снижают коэффициент размножения и отстают в росте по сравнению с контролем.

6. Варьирование источников углеводного питания кардинально не меняет коэффициент размножения. Для сортов Геракл и Метеор максимальный коэффициент размножения получен на средах с 30г/л глюкозы. Использование углевода в концентрации 40 г/л приводило к снижению коэффициента размножения и замедляло рост побегов.

7. Укоренение малины красной на безгормональных средах происходит на 40,2-50,5%, при добавлении в среду ауксина, эффективность укоренения повышается до 60,0 - 75,6%.

8. Производство саженцев на основе клонального микроразмножения высокорентабельно. При выращивании адаптированных растений в кассете уровень рентабельности составил 137,9 %. При выращивании саженцев в горшках уровень рентабельности - 136,3%.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

- 1. Введение в стерильную культуру сортов малины ремонтантной эффективно проводить в весенний период.**
- 2. Для введения в стерильную культуру стерилизации малины ремонтантной рекомендуется применение препарата «Белизна» в разведении 1: 2. Время стерилизации 4 мин.**
- 3. Для эффективного размножения малины рекомендуется использовать среду Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962) дополненную 1,0 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л ГК и двойной концентрацией хелата железа.**

*СПАСИБО
ЗА ВНИМАНИЕ*

