

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43
И73

Редакционная коллегия:

д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси *В. В. Титок* (ответственный редактор),
к.б.н. *П. Н. Белый*; к.б.н. *И. М. Гаранович*; д.б.н. *Н. В. Гетко*;
к.б.н. *Л. А. Головченко*; *С. М. Кузьменкова*; д.б.н. *Е. Н. Кутас*;
к.б.н. *Н. М. Лунина*; к.б.н. *О. В. Чижик*; к.б.н. *А. П. Яковлев*

Рецензенты:

доктор биологических наук, Ботанический институт
имени В. Л. Комарова Российской академии наук *К. Г. Ткаченко*;
кандидат биологических наук, Институт экспериментальной
ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси
А. В. Пугачевский

**Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия
И73 флоры** : материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию
Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (Минск,
28 июня – 1 июля 2022 г.). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. редкол.: В.В. Титок
[и др.] – Минск : Белтаможсервис, 2022. – 420 с.

ISBN 978-985-7004-75-1

В сборнике представлены материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Часть 2: секция 3 «Биотехнологические и молекулярно-генетические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений», секция 4 «Решение вопросов защиты растений в ботанических садах», секция 5 «Научное, прикладное и просветительское значение ботанических коллекций» и секция 6 «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства».

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43

ISBN 978-985-7004-75-1 (ч. 2)
ISBN 978-985-7004-72-0

© ГНУ «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси», 2022
© Оформление. РУП «Белтаможсервис», 2022

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CITRUS L.*

Шутова А. Г.¹, Алехна А. И.¹, Шкеленок В. П.²

¹ Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
anna_shutova@mail.ru

² Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Резюме. Для введения в культуру *in vitro* разработана методика стерилизации эксплантов перспективных представителей рода *Citrus L.* и проведен первоначальный подбор сред. На примере *Citrus meyeri*, *Citrus medica* var. *sarcodactylis*, *Citrus limon* 'Скерневицкий' определена эффективность стерилизации с помощью разработанной методики.

MICROPROPAGATION OF PROMISING REPRESENTATIVES OF THE GENUS *CITRUS L.*

Shutava H., Alechna A., Shkelenok V.

Summary. The method for sterilizing explants of promising representatives of the genus *Citrus L.* and the initial selection of media was carried out to develop *in vitro* culture. On the *Citrus meyeri*, *Citrus medica* var. *sarcodactylis*, *Citrus limon* «Skernevitsky» the effectiveness of sterilization was determined according to the developed method.

Для получения качественного посадочного материала цитрусовых может быть использован метод микроклонального размножения, у которого есть ряд преимуществ перед традиционными способами [1]. Это прежде всего возможность одновременно получить больше растений, поскольку микроклональное размножение обеспечивает, как правило, более высокий коэффициент размножения. С культурами *in vitro* можно работать круглогодично, что также увеличивает выход саженцев. Кроме того, использование метода микроклонального размножения позволяет вырастить оздоровленный посадочный материал со сниженной бактериальной и вирусной нагрузкой.

Первые попытки культивирования цитрусовых *in vitro* в мире относятся к 1960-м годам. К настоящему времени достаточно данных об успешном микроклональном размножении различных цитрусовых как в лабораторных, так и в промышленных масштабах [1, 2, 3, 4, 5]. Технология оказалась удачной для таких объектов, как различные сорта лимона, мандарина, лайма, апельсина, цитрона и помело. В СССР первые исследования в этой области были предприняты Бутенко и Шенгелия в 1980-х годах. До настоящего времени исследования по оптимизации условий микро-размножения цитрусовых не прекращаются, о чем свидетельствует множество зарубежных работ в разных странах, в том числе, в Пакистане, Италии, Индии, Бразилии, США, Египте и др. [1].

Есть и некоторые недостатки метода микроклонального размножения, которые необходимо учитывать. Высокую эффективность регенерации у цитрусовых получают при использовании ювенильных эксплантов [6]. Однако такие растения регенеранты обычно имеют сильно выраженные ювенильные черты, и им необходим продолжительный период до вступления в продуктивный возраст. Поэтому перспективным является использование тканей от взрослых растений элитных сортов цитрусовых. Экспланты, полученные от взрослых растений, редко культивируют *in vitro* главным образом из-за высокого уровня их контаминации, низкой морфогенетической способности и малой способности к укоренению регенерантов. Было усовершенствовано несколько методик для микроразмножения взрослых растений цитрусовых культур. Успешно были получены регенеранты из узловых сегментов взрослых растений мандарина, цитранжа, лайма и апельсина [7].

В качестве исходных тканей для введения в культуру *in vitro* у цитрусовых могут применяться черенки с одной или двумя почками, междоузлия, сегменты семядолей или можно использовать трансплантацию тонкого слоя клеток, полученных от эксплантов междоузлий.

Растения – регенеранты из тонкого слоя клеток не имеют морфологических отклонений вследствие того, что они развиваются прямым органогенезом без стадии образования каллуса, что исключает наличие соматональных вариаций [8].

Успех микроразмножения в первую очередь зависит от удачно подобранных методов стерилизации растительного материала. Это один из самых сложных этапов биотехнологического процесса. Этап стерилизации эксплантов цитрусовых проводят по различным методикам. Например, для стерилизации лимона сорта Павловский в статье [9] стерилизацию проводили следующим образом: замачивание в растворе нейтрального детергента (25 мин); промывка проточной водой (15 мин); обработка 96 % этанолом (5 с); 8% раствором гипохлорита натрия (20–30 мин) с последующей промывкой в трех порциях стерилизованной дистиллированной воды (по 5 мин в каждой). Авторы [10] проводили стерилизацию проводили 0,3 % раствором Велтолен в течение 25 мин. Для обезвреживания экзогенной бактериальной и грибковой микрофлоры авторы [11] использовали 70 % раствор этанола, гипохлорит натрия 5 %, 15 % раствор пероксида водорода, сулемы (0,1 %) и отмывали в стерильной воде (5–10 мин). Наибольшая эффективность в опыте отмечена у препарата гипохлорита натрия концентрации 2,5 % и экспозиции 15 минут. В работе [12] стерилизацию растительного материала проводили по следующей схеме: промывка растительного материала в мыльном растворе; обработка 1% раствором «бриллиант» (0,9–1,0 % р-р акрилдиметил аммоний хлорида и 0,8–0,9 % р-р глутарового альдегида и функциональные компоненты) с экспозицией 5–10 мин; обработка 0,1 % р-ром диацита с экспозицией 25 мин; обработка 0,05 % р-ром хлоргексидина с экспозицией 15 мин.

На этапе введения в культуру экспланты высаживаются, как правило, на питательные среды Мурасиге и Скуга (MS) или КМО – MS. В среду добавляют регуляторы роста – нафтилуксусную кислоту (NAA), 6-бензиламинопурин (BAP). Одной из наиболее перспективных является среда MS с добавлением 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л NAA [13, 14].

На этапе собственно микроразмножения используют среду DKW (Драйвера- Куньюки) с фитогормонами BAP и ГК (гиберелиновая кислота). Хорошие результаты получены на среде DKW с добавлением BAP 2,0 мг/л и ГК 2,0 мг/л [13]. Наиболее оптимальной средой для микроразмножения побегов лимона по мнению авторов [13] явилась среда КМО с добавлением 2 мг/л BAP и 2 мг/л ГК.

В обзоре [1] обобщены 46 литературных источников с вариантами сред для микроразмножения представителей рода *Citrus*. Большинство исследований подтверждают эффективность использования среды MS с добавлением BAP или BAP и NAA. Для лимона также есть данные о эффективности введения кинетина (KIN) в состав среды наряду с BAP и NAA.

Начало роста микропобегов наблюдается, как правило, через одну – две недели после посадки. Появление первого листа происходит через 2–4 недели. Остановка роста эксплантов наблюдается через 5–7 недель после посадки вне зависимости от варианта среды. С каждого материнского экспланта получают около 2,5 дочерних микропобега [1,13].

Материалы и методы исследования. Проведены подбор и оптимизация метода стерилизации эксплантов цитрусовых. Для работы были использованы *Citrus meyeri* Yu. Tanaka, *Citrus medica* var. *sarcodactylis* (Hoola van Nooten) Swingle, *Citrus limon* (L.) Burm. fil. ‘Скерневицкий’. Для введения в культуру *in vitro* использовали молодые побеги текущего года вегетации. В качестве эксплантов использовали сегменты побегов размером 5–10 мм с одним или двумя узлами.

Результаты и обсуждение. В результате подбора оптимального метода стерилизации в качестве оптимальной выбрана следующая схема: 1) промывание эксплантов под проточной водой 10 мин, 2) обработка мыльным раствором в течение 20 мин при перемешивании на магнитной мешалке, 3) выдерживание в растворе 1 г/л препарата Фалькон для избавления от грибной микрофлоры, 4) выдерживание в дезинфицирующем препарате Deso, содержащем алкилдиметилбензиламмоний, дидецилметиламмоний хлорид, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, 5) обработка раствором Миксасмин хлор, представляющего собой натриевую соль дихлориоциануровой кислоты. После каждого этапа стерилизации экспланты дважды промывали стерильной дистиллированной водой.

Использовали концентрацию основного стерилизующего компонента, равную 3 % по действующему веществу. Предварительно время стерилизации подбиралось опытным путем и составляло от 2 до 15 мин. В качестве оптимального времени на основании оценки доли стерильных и жизнеспособных эксплантов выбрана продолжительность обработки основным стерилизующим агентом в течение 5 мин. Экспланты высаживались на среды следующего состава:

- 1) MS с добавлением 0,5 мг/л ВАР (0,5 ВАР);
- 2) MS с добавлением 1 мг/л ВАР (1 ВАР), 0,7 мг/л КИН (0,7 КИН), 0,5 мг/л НАА (0,5 НАА);
- 3) WPM (Woody Plant Medium) с добавлением 0,5 мг/л ВАР (0,5 ВАР).

Результаты, отражающие эффективность разработанного метода стерилизации эксплантов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Влияние разработанного метода стерилизации на стерильность и жизнеспособность эксплантов в условиях *in vitro*

| Объект | Варианты сред | | | | | |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| | MS+0,5 ВАР | | MS+1ВАР+0,7КИН +0,5НАА | | WPM+0,5 ВАР | |
| | доля стерильных эксплантов, % | доля жизнеспособных эксплантов, % | доля стерильных эксплантов, % | доля жизнеспособных эксплантов, % | доля стерильных эксплантов, % | доля жизнеспособных эксплантов, % |
| <i>Citrus meyeri</i> | 50 | 60 | 75 | 71 | – | – |
| <i>Citrus medica</i> var. <i>sarcodactylis</i> | 100 | 25 | – | – | 100 | 67 |
| <i>Citrus limon</i> «Скерневицкий» | 50 | 50 | 75 | 75 | – | – |

Из таблицы видно, доля стерильных эксплантов, полученных по данному методу, составляла более 50 % для всех объектов исследования. При этом доля жизнеспособных эксплантов, оцененная спустя 2–3 недели, различалась на средах различного состава. В целом разработанный метод стерилизации эксплантов является достаточно эффективным и может использоваться для введения в культуру *in vitro* перспективных представителей рода *Citrus* L.

Список литературы

1. Carimi F., De Pasquale F. Micropropagation of Citrus. In: Jain, S.M., Ishii, K. (eds) Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Forestry Sciences, 2003, 75, 589–619.
2. Starrantino A., Caruso A. *In vitro* culture for citrus micropropagation. Acta Horticulturae, 1988, 227, 444–446.
3. Chiancone B., Germanà M. A. Micropropagation of *Citrus* spp. by organogenesis and somatic embryogenesis. Methods Mol Biol., 2013, 11013:99–118.
4. Goswami K., Sharma R., Singh P.K, Singh G. Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers. Physiol Mol Biol Plants., 2013, 19, 1, 137–145.
5. Ali S., Bushra M. Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. Acta Bot Croat, 2006, 65, 2, 137–146.

6. Самарина Л. С., Коломиец Т. М., Горшков В. М. Биотехнология цитрусовых культур: достижения и перспективы Садоводство и виноградарство, 2011, 6, 30–34.
7. Barlass M., Skene K. G.M. In vitro plantlet formation from Citrus species and hybrids. Scientia Horticulturae, 1982, 17, 333–341.
8. Самарина Л. С., Коломиец Т. М., Горшков В. М. Оценка регенерационной способности эксплантов цитрусовых *in vitro*. Садоводство и виноградарство, 2016, 6, 27–30.
9. Шибанова Н. Л., Орлова М. В. Микрклональное размножение *Citrus limon* (L.) Osbeck сорта Павловский. Вестник Пермского университета, 2018, 1, 57–61.
10. Самарина Л. С., Коломиец Т. М. Микроразмножение и сохранение лимона в условиях *in vitro*. Аграрные науки и ветеринарная медицина. Наука Кубани, 2013, 3 37–42.
11. Шох С. С., Сич З. Д., Карпук Л. М. Визначення ефективного способу стерилізації рослинних експлантів лайма *Citrus aurantifolia* та сортів лимона *Citrus lemon* для введення в культуру *in vitro*. Агробіологія, 2020, 2, 185–191.
12. Билалова Э. Г., Ишмуратова М. М. Размножение цитрусовых в культуре *in vitro*. Биологические аспекты распространения, адаптации и устойчивости растений. Материалы всероссийской (с международным участием) научной конференции. Изд-во Мордовского ун-та. Саранск, 2016, 53–55.
13. Самарина Л. С. Оптимизация приемов микроразмножения и сохранения лимона *in vitro*. Автореф. дис: ... канд. биол. наук. М., 2013. – 23 с.
14. Bilalova E. G., Sadykova F. V., Ishmuratova M. M. Initial stages of clonal micropropagation *in vitro* of citrus Bashkir breeding. Biomics, 2018, 10, 2, 153 – –156.