

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 2, Number 32 (2016), 5 – 11

UDC634.737 (574)

**MICROPROPAGATION OF Highbush BLUEBERRY
*VACCINIUM CORYMBOSUM L***

**B.E. Alimbekova, G.A. Kampitova, L.S. Yerbolova,
R.K. Daminova, T.K. Egizbaeva, M.D. Esenalieva**

Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan
baltomi@mail.ru, Yerbolova.Laura@yandex.ru

Key words: micropropagation, *in vitro*, cytokinin, auxin, introduction, explant sterilization, modified medium, axillary shoots.

Abstract. The scientific research work was performed at the Laboratory of Plant Biotechnology of the Kazakh National Agrarian University. The objects of research were varieties of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*) Blue Crop and Brigitte.

The study of the influence of the method of sterilization of the axillary shoots of blueberry output aseptic explants showed that in the version with 5% sodium hypochlorite (NaOCl) «Domestos» at exposure time of 8 minutes maximum percentage of the effectiveness of sterilization for the apexes of shoots was 82%.

As a result of scientific studies it has been established that the most effective introduction to the *in vitro* culture of varieties of blueberry high (survives 85%) occurs on a modified medium Murashige and Skoog (1962), containing macro- and microelements by the prescription, B1 - 0,5 mg / l B6 - 0.5 mg / l, nicotinic acid - 0.5 mg / l; 6 - BAP - 0.5 mg / l NAA - 90 L, sucrose 30 g / l agar - 7g / l, With a doubling of iron chelate.

УДК634.737 (574)

**МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ГОЛУБИКИ
ВЫСОКОЙ *VACCINIUMCORYMBOSUM L***

**Б.Е. Алимбекова, Г.А. Кампитова, Л.С. Ерболова,
Р.К. Даминова, Т.К. Егизбаева, М.Д. Есеналиева**

Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: микрклональное размножение, *invitro*, цитокинин, ауксин, интродукция, эксплант, стерилизация, модифицированная среда, пазушные побеги.

Аннотация. Работа выполнена в лаборатории биотехнологии растений Казахского национального аграрного университета. Объектом исследования служили сорта голубики высокой (*VacciniumcorymbosumL.*) БлюКроп и Бригитта.

Изучение влияния способа стерилизации пазушных побегов голубики на выход асептических эксплантов показало, что в варианте с использованием 5 % гипохлорит натрия (NaOCl) «Domestos» при

экспозиции времени 8 минут максимальный процент эффективности стерилизации для апексов побегов составило 82 %.

В результате проведенных исследований установлено, что наиболее эффективная интродукция в культуру *invitro* сортов голубики высокой (приживается 85 %) происходит на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (1962), содержащей макро- и микроэлементы по прописи, В1 – 0,5 мг/л, В6 – 0,5 мг/л, никотиновую кислоту – 0,5 мг/л; 6 – БАП - 0,5 мг/л, НУК - 90 мкл, сахарозу 30 г/л, агар-агар – 7г/л., с удвоенным содержанием хелата железа.

Введение

Голубика высокая является источником ценных пищевых и биологически активных веществ различного фармакологического действия. Витамины А, С, Е, антоцианы, флавоноиды, а также микроэлементы (цинк, медь, селен, марганец), содержащиеся в плодах оказывают антиоксидантное действие. Растительные гормоны — фитоэстрогены — предохраняют организм от атеросклероза и болезней сердца, снижая уровень холестерина [1-3].

В последнее время голубика высокая *Vacciniumcorymbosum L.* завоевала большую популярность не только среди садоводов-любителей, но и у предприятий и фермерских хозяйств, специализирующихся на производстве плодово-ягодной продукции. Каждым годом возрастает спрос на посадочный материал. И спрос этот удовлетворить только за счет методов черенкования *invivo* уже невозможно. Поэтому все более широкое применение находит метод микроклонального размножения, преимущества которого бесспорны [4]. Для голубики высокорослой (*VacciniumcorymbosumL.*) метод размножения *invitro* является экономически выгодным [5 - 7].

Следует отметить, что для культивирования в условиях *invitro* требуется применение определенного состава культуральной питательной среды. Способность к размножению на искусственных питательных средах *invitro* зависит от индивидуальных особенностей каждого испытываемого генотипа растения.

Опыт микроклонального размножения голубики высокой (*VacciniumcorymbosumL.*) показывает, что температурный оптимум культивирования *invitro* 28–30°C. Культивирование в этом диапазоне температур позволяет значительно ускорить рост и развитие адвентивных побегов. Использование оптимального соотношения цитокининов и ауксинов как гормонального фона культивирования позволяет увеличить коэффициент размножения до 8–10. Состав классической WPM_среды может быть модифицирован по содержанию сахарозы, макро- и микроэлементов, что позволяет ускорить культивирование с 8 до 4 недель [8].

Цель исследования – разработать оптимальные составы питательных сред для интродукции эксплантов различных сортов голубики высокой *invitro* в процессе клонального микроразмножения.

Объекты и методы исследований. Работа выполнена в лаборатории биотехнологии растений Казахского национального аграрного университета. Объектом исследования служили сорта голубики высокой (*VacciniumcorymbosumL.*) БлюКроп и Бригитта.

Исходный материал был собран из КХ «Тургень» Енбекшиказахского района Алматинской области.

Вычленение апикальной меристемы и микроклонального размножения растений проводились по методике Бутенко Р.Г. и Калашникова Е.А [9-10].

Стерилизация эксплантов проводилась в трех этапах:

- экспланты перед стерилизацией тщательно отмываются проточной водопроводной водой, очищаются от излишних тканей с помощью скальпеля. Предварительная стерилизация эксплантов – более длительная процедура, зависящая от степени их загрязнённости (30 мин.).
- собственно стерилизация. Предварительно простерилизованные экспланты помещаются в стерилизующий раствор. Необходимое условие процесса собственной стерилизации – это обеспечение достаточной степени чистоты объекта, и сохранность его жизнеспособности.
- постстерилизация. Отмывание растительных эксплантов от стерилизующего раствора порциями автоклавированной воды.

Стерилизацию растительного материала голубики осуществляли по методике с использованием коммерческого препарата 1 % гипохлорита натрия (NaOCl) «Белизна» и 5 % гипохлорита натрия (NaOCl) «Domestos» разведенного стерильной водой в объемном соотношении

1:4. В раствор добавили две капли Твина-20 в качестве поверхностно-активного вещества для повышения растворения.

Время обработки для каждого стерилизующего раствора составило от 4 до 8 минут. После стерилизации все незараженные экспланты высаживались на различные питательные среды: модифицированную среду инициации меристем (ИМ) [11], Андерсона и на модифицированных средах Мурасиге и Скуга (МС) [12]. Эффективность стерилизации оценивали по количеству не зараженных после стерилизации эксплантов.

Стерилизацию материала проводили в несколько этапов под ламинарным боксом:

1. Промывка в мыльном растворе 30 мин
2. Промывка в проточной воде 30 мин
3. 1 % гипохлорит натрия (NaOCl) «Белизна» или 5 % гипохлорита натрия (NaOCl) «Domestos» – 4 и 8 мин.
4. Промывка стерильной водой 5–6 раз

Состав питательных сред для культивирования голубики высокой приведены в таблице 1.

На среде Андерсона приживаемость составила в среднем 5,9 %; на среде ИМ – 1,8 %. В дальнейшем пазушные побеги плохо развивались и были сняты с пассирования.

Таблица 1 - Состав питательных сред Андерсона и ИМ

Состав питательной среды, мг/л	Концентрация в среде(мг/л)	
	Андерсона	ИМ
Макроэлементы		
NH ₄ NO ₃	400	400
KNO ₃	480	1050
MgSO ₄ *H ₂ O	180	370
K ₂ HPO ₄	330,6	200
Na ₂ HPO ₄	-	200
CaCl ₂ *2H ₂ O	342,2	-
Микроэлементы		
KJ	0,3	0,83
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
MnSO ₄ *4H ₂ O	16,9	22,3
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	8,6
Na ₂ MoO ₄	0,25	0,25
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,0025	0,025
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	0,025
FeSO ₄ *7H ₂ O	55,7	27,8
Na ₂ ЭДТА*2H ₂ O	74,5	37,3
Витамины		
Мезоинозит	100	100
Тиамин(В1)	0,5	0,1
Пиридоксин(В6)	0,5	0,5
Никотиновая кислота(РР)	0,5	0,5
Фитогормон 6-БАП	-	10
НУК	-	90 мкл
Глицин	2	-
Сахароза	30000	30000
Агар	7000	7000
pH	5,7±0,1	5,7±0,1

Питательную среду Мурасиге-Скуга (М-С) модифицировали в двух вариантах (таблица 2). Все варианты содержали макро- и микроэлементы стандартные по прописи М-С (1962); витамины:

В1 – 0,5 мг/л, В6 – 0,5 мг/л, никотиновую кислоту – 0,5 мг/л; двойное содержание хелата железа, сахарозу 30 г/л, агар-агар – 7 г/л.

В состав первого варианта (М-С 1) дополнительно введён 6-БАП (0,5 мг/л) и НУК 90 мкл, отсутствием аденина и рН 5,0.

Во втором варианте (М-С 2): 6-БАП (2 мг/л) и аденина (0,5 мг/л), отсутствием НУК и рН 5,7.

Таблица 2 – Модифицированные варианты питательной среды Мурасиге –Скуга

Состав	Модификация среды МС, мг/л	
	М-С 1	М-С 2
Макроэлементы	стандарт	стандарт
Микроэлементы	стандарт	стандарт
Fe-хелат	удвоенное содержание	удвоенное содержание
Мезоинозит	100	100
Тиамин(В1)	0,5	0,5
Пиридоксин(В6)	0,5	0,5
Никотиновая кислота(РР)	0,5	0,5
6-БАП	0,5	2
НУК	90 мкл	-
Аденин	-	0,5
Глицин	2	2
Сахароза	30000	30000
Агар	7000	7000
рН	5,0	5,7

Результаты интродукции пазушных побегов голубики высокой при посадке на модифицированную среду Мурасиге-Скуга представлены в таблице 5, (рисунок 2).

Результаты исследований

Стерилизация эксплантов

Стерилизация и правильный выбор стерилизующего вещества является первым и основным этапом для успешного культивирования голубики в условиях *invitro*. Стерилизующие вещества должны меньше повреждать растительный экплант и легко удаляться из тканей промыванием стерильной дисстилизованной водой.

Таблица 3 - Влияние способа стерилизации пазушных побегов голубики на выход асептических эксплантов

Стерилизующее вещество	Экспозиция, мин.	% выхода
1 % гипохлорит натрия (NaOCl) «Белизна»	4	10
	8	12
5 % гипохлорит натрия (NaOCl) «Domestos»	4	40
	8	82

Сравнительный анализ полученных данных позволил установить, что в варианте с использованием 5 % гипохлорит натрия (NaOCl) «Domestos» при экспозиции времени 8 минут максимальный процент эффективности стерилизации для апексов побегов составляет 82 %. При использовании 1 % гипохлорит натрия (NaOCl) «Белизна» с экспозицией 8 минут максимальный процент эффективности стерилизации для пазушных побегов составляет 12 %.

Таким образом, проведенное нами изучение условий асептического ввода в культуру сортов голубики показало, что наилучшие результаты получены при использовании 5 % гипохлорит натрия (NaOCl) с экспозицией 8 минут «Domestos» для поверхностной стерилизации пазушных побегов. Гибель эксплантов в этом варианте минимальная по сравнению в варианте с 1 % гипохлоритом натрия (NaOCl) «Белизна».

Микроклональное размножение

Следует отметить, что для культивирования в условиях *invitro* требуется применение определенного состава культуральной питательной среды. Способность к размножению на

искусственных питательных средах *in vitro* зависит от индивидуальных особенностей каждого испытуемого генотипа растений.

Каждое субкультивирование длилось 25–30 дней. До автоклавирования рН среды доводили до $5,5 \pm 0,1$ и $5,7 \pm 0,1$, автоклавировали при 120°C , 1 атм. в течение 20 мин.

Экспланты вычленились в асептических условиях в ламинарных боксах и с помощью скальпеля и пинцета. Культивировали их в пробирках (Рисунок 1).



Рисунок 1- Введение в культуру *in vitro* сортов голубики высокой (*Vacciniumcorymbosum*L.)

На питательных средах Андерсона и ИМ у эксплантов голубики высокой при их интродукции установлен низкий уровень приживаемости пазушных побегов (таблица 4).

Таблица 4 – Приживаемость пазушных побегов голубики высокой на питательных средах Андерсона и ИМ

Сорт	Среда Андерсона			Среда ИМ		
	посажено, шт.	прижилось, шт.	%	посажено, шт.	прижилось, шт.	%
БлюКроп	26	2	7,7	28	1	3,6
Бригитта	24	1	4,2	30	0	0
в среднем			5,9			1,8

Таблица 5 - Приживаемость пазушных побегов голубики высокой на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга

Сорта	М-С 1			М-С 2		
	посажено, шт.	прижилось, шт.	%	посажено, шт.	прижилось, шт.	%
БлюКроп	28	25	89,3	24	12	50
Бригитта	26	21	80,8	28	12	42,8
в среднем			85			46,4

Анализ результатов исследования показывает, что в первом варианте модифицированной среды Мурасиге-Скуга (М-С 1) приживаемость эксплантов по сортам имела максимальный уровень (в среднем 89,3 %)

Выделившийся вариант питательной среды отличается содержанием 6-БАП 0,5 мг/л и НУК 90 мкл отсутствием аденина. Несколько ниже эффективность интродукции пазушных побегов в культуру *in vitro* на питательной среде М-С 2 (50 %). Её состав отличается от М-С 1 большим содержанием 6-БАП (2 мг/л) и аденина (0,5 мг/л) и отсутствием НУК.

Выводы. Сравнительный анализ полученных данных позволил установить, что в варианте с использованием 5 % гипохлорит натрия (NaOCl) «Domestos» при экспозиции времени 8 минут максимальный процент эффективности стерилизации для апексов побегов составляет 82 %. При

использовании 1 % гипохлорит натрия (NaOCl) «Белизна» с экспозицией 8 минут максимальный процент эффективности стерилизации для пазушных побегов составляет 12 %.



Рисунок 2- микрклональное размножение сорта БлюКроп голубики высокой (*Vacciniumcorymbosum*L.)

В результате проведённых исследований установлено, что наиболее эффективная интродукция в культуру *in vitro* сортов голубики высокой (приживается 85 %) происходит на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (1962), содержащей макро- и микроэлементы по прописи, В1 – 0,5 мг/л, В6 – 0,5 мг/л, никотиновую кислоту – 0,5 мг/л; 6 – БАП – 0,5 мг/л, НУК – 90 мкл, сахарозу 30 г/л, агар-агар – 7г/л., с удвоенным содержанием хелата железа. Модификации среды М-С 2 показали меньшую эффективность интродукции в культуру *in vitro* (46,4 %). На питательных средах Андерсона и ИМ приживаемость эксплантов изучаемых сортов голубики низкая – 1,8-5,9 %.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Майнланд С.М. Обзор новой информации по основам медицинской помощи о голубике МайнландС.М., Тюкер Ж.В. Департамент науки садоводства, Северная Каролина, Национальный университет, 3800 Дорога КастлХайн, СК 28429, США mainland@unity.ncsu.edu *Vaccinium* Седьмой Международный симпозиум по вопросам культуры, Терма-де-Чильян, Чили, их материалы. 4_9 декабрь 2000. Акта Плодоовощеводство (574) Левен: Международное общество по садоводческой науке (МОСН), 2002 -39-43с.
- [2] Антоцианы, извлеченные из китайской черники (*Vacciniumuliginosum*L.) его противораковые эффекты на МГ 1 и Colo205 клеток. ЗуХиа Ян, Высшая школа жизни и наук об окружающей среде, Университет Цкуба, Цкуба 305_8572, Япония. Китайский Медицинский журнал (Пекин) 123 (19) Пекин: Китайской медицинской ассоциации (Пекин), 2010.— С. 2714–2719.
- [3] Голубика флювоноиды подавляют матричных металлопротеинов деятельность в DU145 клеток человеческого рака простаты. М.Д. Матчет Биохимия и клеточная биология; 2005. — Том 83. — № 5. - С. 637-643
- [4] Антоцианы, извлеченные из китайской черники (*Vacciniumuliginosum*L.) его противораковые эффекты на МГ 1 и Colo205 клеток. ЗуХиа Ян [др.] Высшая школа жизни и наук об окружающей среде, Университет Цкуба, Цкуба 305_8572, Япония. Китайский Медицинский журнал (Пекин) 123 (19) Пекин: Китайской медицинской ассоциации (Пекин), 2010. — С. 2714–2719.
- [5] Иванович А.А. Микрклональное размножение голубики высокой А.А. Иванович, Интенсиф. плодоовощевод.; Беларус. с.-х. акад. Горки, 1992. С. 47-50.
- [6] Попович Е.А. Влияние экзогенного цитокинина на жизнеспособность эксплантов голубики высокой *in vitro*, Е.А. Попович, В.Л. Филиппеня, Физиология растений 1997. № 1. С. 104-107.
- [7] Сидорович Е.А. Клональное микро размножение интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной в культуре *in vitro* связи с генотипами, Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас, Вести АН Беларуси. Сер. биол. науки. Минск, 1998. № 3. С. 5-9.
- [8] Грибок Н.А., Зубарев А.В., Репетников В.Н. Оптимизация условий культивирования голубики высокой *Vacciniumcorymbosum*L. *in vitro*. Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы. Материалы Республиканской научно-практической конференции. Минск. 2012. - С.23-26.
- [9] Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1991.–160 с.с.
- [10] Калашникова Е.А., Дегтярев С.В. и др.: Под ред. В.С. Швелухи. – М.: Высш. шк., 1998. С. 416.

[11] Мезетти Б., Пандолфини Т., Наваччи О., Ланди Л. Генетическая трансформация винограда культурный помощью органогенез, ВМС биотехнологии. - 2002. - Т.2: 18

[12] МурашиджТ., Ског Ф., Пересмотренная среда для быстрого роста и биопробы с табачных тканевых культур., Физ. растений – 1962.–Том 15.С.473-497.

REFERENCES

[1] Mainland C. M. Blueberry health information _ some new mostly review. C. M. Mainland, J. W. Tucker, Horticultural Science Department, North Carolina State University, 3800 Castle Hayne Road, Castle Hayne, NC 28429, USA. mainland@unity.ncsu.edu, Proceedings of the Seventh International Symposium on *Vaccinium* Culture, Termas de Chillan, Chile, 4-9 December 2000, Acta Horticulturae (574) Leuven: International Society for Horticultural Science (ISHS), 2002. P. 39–43 (in Eng.).

[2] Anthocyanins extracted from Chinese blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) and its anticancer effects on DLD_1 and COLO205 cells. ZuXiaoYan [et al.] Graduate School of Life and Environmental Sciences, Tsukuba University, Tsukuba 305 8572, Japan. Chinese Medical Journal (Beijing) 123 (19) Beijing: Chinese Medical Association (Beijing), 2010. P. 2714–2719 (in Eng.).

[3] Blueberry flavonoids inhibit matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells. M. D. Matchett, Biochemistry & Cell Biology; 2005. Vol. 83. N 5. P. 637–643 (in Eng.).

[4] Anthocyanins extracted from Chinese blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) and its anticancer effects on DLD_1 and COLO205 cells. ZuXiaoYan [et al.] Graduate School of Life and Environmental Sciences, Tsukuba University, Tsukuba 305 8572, Japan. Chinese Medical Journal (Beijing) 123 (19) Beijing: Chinese Medical Association (Beijing), 2010. P. 2714–2719 (in Eng.).

[5] Ivanovich A. A. Micropropagation highbush blueberry. A. A. Ivanovich, Inten. horticulture.; Belarus. agricultural Acad. Gorki, 1992. P. 47-50 (in Russ.).

[6] Popovich E. A. Effect of exogenous cytokinin on the viability of the explants blueberry high *in vitro*. E. A. Popovich, V. L. Filipeniya, Fiziol. plant. 1997. № 1. P. 104-107 (in Russ.).

[7] Sidorovich E. A. Micropropagation introduced varieties of blueberries and cranberries ordinary high in culture *in vitro* in connection with genotypes. E. A. Sidorovich, E. N. Kutas, News NASB. Ser. biol. science. Minsk, 1998. № 3. P. 5-9 (in Russ.).

[8] Gribok N. A., Zubarev A. V., Reshetnikov V. N. Optimization culture conditions highbush blueberry *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro*. Blueberry in Belarus: Results and Perspectives. Materials of Republican scientific – practical conference. Minsk. 2012. P. 23–26 (in Russ.).

[9] Butenko R. G. Higher plant cell biology *in vitro* and biotechnology based on them: Proc. posobie.- M.: FBK-Press, 1991.- 160 p. from (in Russ.).

[10] Kalashnikov EA, Degtyarev SV etc.: Under. Ed. VS Shevelukha.- M.: Higher. HQ., 1998. 416 pp (in Russ.).

[11] Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O., Landi L. Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis, BMC Biotechnology. 2002. V.2:18 (in Russ.).

[12] Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol Plant. – 1962. V.15. P.473-497 (in Russ.).

VACCINIUM CORYMBOSUM L БИІК КӨКЖИДЕКТИҢ МИКРОКЛОНДЫҚ КӨБЕЙЮ

Б.Е. Алимбекова, Г.А. Кампитова, Л.С. Ерболова,
Р.К. Даминова, Т.К. Егизбаева, М.Д. Есеналиева

Қазақ Ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан

Түйін сөздер: микроклондық көбейту, *in vitro*, цитокинин, ауксин, жерсіндіру, эксплант, зарарсыздандыру, түрлендірілген орта, жас өскіндер.

Аннотация. Жұмыс Қазақ ұлттық аграрлық университетінің өсімдіктер биотехнологиясы зертханасында орындалды. Зерттеу нысаны ретінде биік көкжидектің (*Vaccinium corymbosum* L.) Блю Кроп және Бригиттасорттары алынды.

Көкжидектің жас өскіндерін зарарсыздандыру әдісінің аseptикалық экспланттардың шығуына әсерін зерттеу 8 минут уақыт экспозициясы кезінде «Domestos» 5 % натрий гипохлоратын (NaOCl) қолдану нұсқасында өркен апексі үшін зарарсыздандыру тиімділігінің максималды пайызы 82 % құрайтындығын көрсетті.

Жүргізілген зерттеу нәтижесінде биік көкжидектің *in vitro* сұрыптарының өсімдігіне тиімді жерсіндіру (85 % жерсінеді) құрамында макро- және микроэлементтер, В1 – 0,5 мг/л, В6 – 0,5 мг/л, никотин қышқылы – 0,5 мг/л; 6 – БАП - 0,5 мг/л, НУК - 90 мкл, сахароза 30 г/л, агар-агар – 7г/л., темір хелатының екі еселенген мөлшері бар Мурашиге-Скуг (1962) түрлендірілген қоректі ортасында болатындығы анықталды.