На правах рукописи

Аль-Дейени Муаяд Насеир Муслим

# ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ УСКОРЕННОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ЦЕННЫХ ЛИНИЙ БАКЛАЖАНА *IN VITRO*

Специальность: 06.01.05 - селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Орёл – 2020

Работа выполнена на кафедре растениеводства, селекции и овощеводства ФГБОУ ВО «Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина» на базе лаборатории селекции, овощеводства и садоводства, клонирования УНИЦ «Агротехнопарк» ФГБОУ ВО «Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина» в 2015-2019 гг.

| | |
|---|---|
| **Научный руководитель:** | **Кощарева Надежда Викторовна** доктор сельскохозяйственных наук ФГБОУ ВО «Белгородский государственный аграрный университет имени В. Я. Горина, доцент, профессор кафедры растениеводства, селекции и овощеводства |
| **Официальные оппоненты:** | **Бухарова Альмира Рахметовна** доктор сельскохозяйственных наук, профессор, профессор кафедры агрохимии, защиты растений и химии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный заочный университет»<br><br>**Бохан Александр Иванович** доктор сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории овощных культур и картофеля научно-исследовательского отдела генофонда растений ФГБНУ «Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства» |
| **Ведущая организация:** | ФГБОУ ВО «Мичуринский государственный аграрный университет» |

Защита состоится «  » 2020 г. В часов на заседании диссертационного совета Д 999.059.04 при ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина» по адресу: 302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, 69.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в читальном зале библиотеки Орловского ГАУ (г. Орел, ул. Бульвар Победы, 19), на официальном сайте ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина» http: orelsau.ru и на сайте ВАК Минобрнауки РФ http:vak.minobrnauki.gov.ru

Автореферат разослан «  » 2020 г.

Просим присылать письменный отзыв на автореферат в двух экземплярах, заверенных и скрепленных гербовой печатью, ученому секретарю диссертационного совета. Факс: 8(4862)43-13-01, e-mail: dissovet-orelsau@yandex.ru.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор сельскохозяйственных наук,
доцент Резякова Светлана Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

В селекционной работе при создании источников устойчивости к фитопатогенным организмам и к неблагоприятным климатическим условиям используют спектр различных методологических подходов. Для оценки генетического материала на толерантность к болезням широко используют культуру *in vitro*, обеспечивающую высокую эффективность отбора (Gourd J. 1988; Uragami A., 1990; Graniti A., 1991, Lebeda A. 1997; Švábová L., 2001; Singh D. P., 2005). Этот метод позволяет отбирать клеточные популяции, устойчивые к селективному фактору с дальнейшей регенерацией растений, существенно оптимизировать и ускорить селекционный процесс. Применение биотехнологических методов для повышения устойчивости растений баклажана и ускоренного их размножения с минимальными затратами требует углубленного изучения ряда теоретических и методических аспектов. Особенно важным является поиск более надежных критериев оценки и методов отбора в культуре тканей и подбор оптимальных питательных сред для размножения баклажана и для ускоренного получения линейного материала, устойчивого к биотическим и абиотическим факторам. В связи с развитием овощеводства защищенного грунта в Белгородской области и с целью импортозамещения возникла потребность в разработке методов ускоренного размножения ценных линий баклажана и получения на их основе сортов и гибридов для современных зимних теплиц (Шабетя О.Н., 2018).

**Цель исследований:** оптимизация питательной среды для ускоренного размножения ценных линий баклажана *in vitro*.

**Задачи исследований:**

- подобрать условия стерилизации баклажана для клонального микроразмножения.
- Изучить и оптимизировать состав питательных сред для регенерации культуры баклажана.
- Изучить влияние температурных условий на культивирование баклажана в культуре *in vitro*.
- Определить условия адаптации растений-регенерантов баклажана к условиям *in vivo*.
- Рассчитать экономическую эффективность использования биотехнологических методов при создании и размножении ценного линейного материала баклажана.

**Научная новизна работы.** Впервые усовершенствован способ ускоренного размножения ценных линий овощных растений семейства *Solanaceae* L. в культуре *in vitro*, который заключается в разработке

эффективной регенерационной системы для индукции каллусогенеза и морфогенеза эксплантатов баклажана, за счет усовершенствования питательной среды, что обеспечивает максимальный коэффициент размножения и регенерацию растений в культуре *in vitro*.

**Практическая ценность работы.** В результате проведенных исследований разработаны методические рекомендации по клеточной технологии создания и размножения исходного селекционного материала баклажана в культуре *in vitro*, для ускорения селекционного процесса, а также внедрение в учебный процесс Белгородского государственного университета им. В. Я. Горина и других учебных заведений. Используя размноженный *in vitro* материал, в соавторстве передан новый сорт баклажана Снежная лавина в ФГБУ «Государственная комиссия по испытанию и охране селекционных достижений РФ».

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1.Условия стерилизации эксплантов баклажана при микроклональном размножении.

2. Оптимизация питательных сред для индукции каллусогенеза и морфогенеза эксплантатов баклажана

3. Разработка системы адаптации регенерантов в условия in vivo.

**Апробация работы.** Результаты исследований апробированы на: I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященный 140-летию НИУ БелГУ и 100-летию со дня рождения селекционера, ученого и педагога, доктора с.-х. наук, профессора Щелоковой Зои Ивановны (Белгород, 24-26 ноября 2016 года), Международной научно-технической конференции «Биотехнология, генетика, селекция в лесном и сельском хозяйстве, мониторинг экосистем» (Воронеж, 21-22 июня 2017). Международной научно-практической конференции «Современные проблемы адаптации (Жученковские чтения IV», Белгород, 24–26 сентября 2018 г.); XVII Международной научно-практической конференции: Фундаментальные и прикладные научные исследования: Актуальные вопросы, достижения и инновации (г. Пенза, 15 ноября 2018), XXIII международной научно-производственной конференции «Инновационные решения в аграрной науке – взгляд в будущее». (Белгород, 2019 г.).

**Публикации**. По результатам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе – 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 2 статьи в зарубежных журналах, входящих в базу Scopus.

**Личный вклад автора в работу**. Автор принимал участие в планировании эксперимента, постановке целей и задач исследований.

Самостоятельно проводил лабораторные исследования, анализ и обобщение полученных данных. Доля личного участия в выполнении работы и написании статей – 80 %.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 134 страницах компьютерного текста, включает 21 таблицу, 10 рисунков. Состоит из введения, списка сокращений, 6 глав, заключения, рекомендаций, списка использованной литературы. Библиографический список содержит 252 источника, из них 165 на иностранном языке.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Проведен анализ источников литературы отечественных и зарубежных авторов по изучению биотехнологических способов создания селекционного материала, питательных сред и их составляющих.

## УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в лаборатории селекции овощеводства, цветоводства, клонирования УНИЦ «Агротехнопарк» ФГБОУ ВО «Белгородский государственный аграрный университет имени В. Я. Горина» в 2015-2019 гг. Использовали ламинарный бокс, фитотрон и зимнюю стеллажную теплицу № 1.

Материал для исследований: селекционные образцы баклажана лаборатории овощеводства (15 линий $F_{4-5}$ стабильные по морфологическим показателям, источники комплекса хозяйственно-ценных признаков). При проведении исследований в культуре *in vitro* использовали методические рекомендации, изложенные в работах Р. Г. Бутенко (1999), Е. А. Калашникова (2012), а также стандартные приемы стерилизации питательных сред, инструментов и лабораторного оборудования.

В качестве дезинфицирующих веществ использовали растворы гипохлорита натрия (1 %, 1,7 %, 2,6 %). Продолжительность стерилизации эксплантатов в стерилизующих растворах составляла от 15, 25, 40 минут. Контроль – 1,7 % раствор гипохлорита натрия с экспозицией 15 минут.

Первичными эксплантами служили семядольные листья и гипокотили 7-дневных проростков семян баклажана. Экспланты культивировали на агаризованной среде в условиях климатической камеры. Условия культивирования: освещенность — 3,0-4,0 тыс. лк, фотопериод — 14 ч, температура — 17 °С (ночь) - 22 °С (день).

Семена баклажана помещали в мыльный раствор, промывали в проточной чистой воде, ополаскивали дистиллированной. Далее семена погружали для стерилизации в 70 % спиртовой раствор, затем в 6 % раствор хлорамина Б на 1-3 мин, затем троекратно промывали в автоклавированной дистиллированной воде. Для определения оптимально-

го состава питательной среды для каллусообразования изучали 6 вариантов: «MS+0,1мг/л 6-БАП», «MS+0,5л 6-БАП», «MS+1 мг/л 6-БАП», «MS+0,1мг/л Мивал-агро», «MS+0,5 мг/л Мивал-агро», «MS+1 мг/л Мивал-агро», контроль – «MS б/г (безгормональная среда)».

Для определения оптимального состава питательной среды для укоренения эксплантов изучали 7 вариантов: «1/2 MS б/г»; «MS+0,5/2 мг/л ИУК»; «MS+1 мг/л ИУК»; «MS+2 мг/л ИУК»; «1/2 MS+0,5/1/2 мг/л ИУК»; «1/2 MS+1 мг/л ИУК»; «1/2 MS+2 мг/л ИУК»; контроль – «MS б/г (безгормональная среда)».

Для определения условий адаптации растений-регенерантов баклажана к условиям *in vivo,* пробирочные растения высаживали на субстраты: 1) чернозем типичный, 2) грунт торфяной универсальный «Агробалт» (тепень разложения торфа – до 20 %, pH ($H_2O$) – 5,5–6,6 %, pH (KCl) – 5,0–6,2 %, содержание питательных элементов не менее: азот (N) – общий – 150 мг/л; фосфор ($P_2O_5$) - 150 мг/л; калий ($K_2O$) - 250 мг/л; магний (Mg) - 30 мг/л; кальций (Ca) - 120 мг/л + микроэлементы) + перлит 20 %, 3) грунт почвенный универсальный (азот ($NH_4$ + $NO_3$) - 170 мг/л; фосфор ($P_2O_5$) – 160 мг/л; калий ($K_2O$) - 270 мг/л; pH (KCl) – 5,5) + чернозем типичный (1:1).

Проводили фенологические наблюдения, биометрические измерения, учитывали: генотипы, донорские органы (семена) и протоколы питательных сред; сроки пересадки пробирочного материала; количество жизнеспособных эксплантов через 10 суток после введения в культуру *in vitro*; число образованных побегов, высота, длина корней, число листьев в конце каждого этапа; новообразования в культуре *in vitro* – частота каллусогенеза и морфогенеза (%), объем каллуса ($мм^3$).

Окраску и структуру каллусных тканей определяли визуально согласно методу оценки, предложенным С. І. Волощуком (2010). Параметры адаптивной способности и стабильности признаков устанавливали согласно методическим указаниям А. В. Кильчевського и Л. В. Хотылёвой (1985). Статистическую обработку экспериментального материала проводили по Б. А. Доспехову (1985).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1. Подбор условий стерилизации баклажана для микроклонального размножения

В результате исследований было установлено, что эффективность стерилизации зависела от дезинфицирующего вещества, его концентрации, продолжительности стерилизации, числа её этапов, физиологического состояния, фазы развития и условий выращивания растения-донора, индивидуальной чувствительности каждого конкретного образца к разным дезинфицирующим веществам. Наилучший эффект

был получен при использовании 2,6 % раствора гипохлорита натрия с экспозицией 15 минут в растворе, что позволило получить 69,5 % жизнеспособных эксплантов (рис. 1). Это в 2,9 раз превышает показатель контрольного варианта.

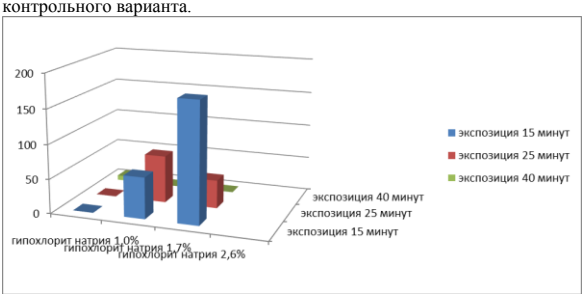



Рис. 1. Влияние концентрации и длительности экспозиции на жизнеспособность эксплантов.

## 2. Оптимизация состава питательной среды при микроразмножении баклажана

При разработке схем исследований нами принято во внимание, что семена линий баклажана по происхождению относятся к восточно-азиатскому подвиду, нуждаются в этапе проращивания с переменными высокими температурами воздуха. Именно о таких особенностях развития подчеркивали ученые L.I. Xiangqian и F.S. Krasnyanski (2002). Особенностью семян баклажана является наличие плотной семенной кожуры, сложное строение клеток эпидермиса и кожуры, а также утолщение клеточной оболочки (Шабетя О.Н., 2017, 2018), которые нельзя удалить без травмирования зародыша.

Проращивали семена при постоянной температуре (25°С) и переменных температурах (трое суток при температуре 25°С, последующие 3 суток – 35°С). Эффективность прорастания семян баклажана при стандартных температурах оказалась менее результативной, чем при проращивании семян на питательных средах при переменных температурах (табл. 1).

Во время культивирования линий баклажана в условиях переменных температур процент проросших семян увеличился. Проросли семена баклажана у 87 % линий на безгормональной питательной среде MS при переменных температур культивирования. Проращивание

семян баклажана на питательной среде при температуре 25ºС обеспечило формирование от 1 % до 4 % проростков, или у 40 % высаженных генотипов.

Таблица 1 - Эффективность проращивания семян баклажана при стандартной и переменной температурах в условиях *in vitro* (среднее по 3 повторениям)

| Линия (№ каталога) | Питательная среда | Высажено семян, шт. | Получено проростков при температурах | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | стандартных | | переменных | |
| | | | шт. | % | шт. | % |
| К-1* | MS б/г | 100 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| К-3* | MS б/г | 100 | 3 | 3 | 21 | 21 |
| К-5* | MS б/г | 100 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| К-9 | MS б/г | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| К-10 | MS б/г | 100 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| К-11 | MS б/г | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| К-12 | MS б/г | 100 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| К-13* | MS б/г | 100 | 1 | 1 | 21 | 21 |
| К-18 | MS б/г | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| К-20 | MS б/г | 100 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| К-22 | MS б/г | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| К-24* | MS б/г | 100 | 4 | 4 | 26 | 26 |
| К-25 | MS б/г | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| К-27* | MS б/г | 100 | 4 | 4 | 14 | 14 |
| К-28* | MS б/г | 100 | 1 | 1 | 11 | 11 |
| Среднее | | | 0,93 | - | 8,2 | - |

Отмечали увеличение общего числа проросших семян - до 26 штук на 100 семян. Колебания температур способствовало растрескиванию плотной клеточной оболочки, обеспечивая условия для прорастания семян. При оценке влияния испытуемых температурных режимов культивирования (фактор В) на инициацию прорастания семян различных сортовых генотипов баклажана (фактор А) выявлена статистическая значимость всех факторов, а также влияние их взаимодействия на конечный признак - инициацию прорастания семян. При этом

сила влияния генотипа баклажана (фактор А) оказалась самой большой – 94 % (табл. 2).

Таблица 2 - Влияние разных факторов на прорастание семян линий баклажана в культуре *in vitro* (результаты дисперсионного анализа)

| Фактор | Среднее значение, $X_{ср} \pm S_{Xср}$ | Коэффициент вариации, $V \pm S_V$ | Дисперсия | $F_{факт}$ | $F_{теор}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| А (генотип) | 4,6±0,8 | 23,6±5,2 | 556,96 | 1,6 | 1,1 |
| В (температурный режим) | 8,2±1,6 | 28,9±6,3 | 835,21 | 2,0 | 1,4 |

При оценке влияния температурных режимов культивирования (фактор В) на инициацию прорастания семян различных сортовых генотипов баклажана (фактор А) выявлена статистическая значимость всех факторов, а также влияние их взаимодействия на конечный признак - инициацию прорастания семян. При этом сила влияния взаимодействия факторов (фактор АВ) оказалась наибольшей – 74 % (табл. 3).

Таблица 3 - Статистическая значимость факторов, а также влияние их взаимодействия на конечный признак - инициацию прорастания семян

| Режим культивирования (В) | | | Генотипы (А) | Среднее за фактором А |
|---|---|---|---|---|
| | Переменные температуры | Постоянные температуры (контроль) | | |
| Среднее за В | 8,2 | 0,93 | | 4,6 |
| Влияние фактора, % | | А | 62 | |
| | | В | 44 | |
| | | АВ | 74 | |

Установлено, что разрезание семенной кожуры семян баклажана, после 2-3 недель культивирования в условиях *in vitro*, не имеет положительного влияния на получение проростков. В течение дальнейшего культивирования (через 2-3 недели) в местах надрезов отмечали интенсивное образование каллуса, но после его пересадки на безгормональную среду MS получали при регенерации образование адвентивных побегов, у которых была высокая вероятность возникновения в каллусных тканях самоклональных вариантов. Такой тип размножения нельзя рекомендовать для последующего использования.

Для усовершенствования питательной среды стандартную среду MS модифицировали вносили 6-бензиламинопурин (БАП) и биоорганический регулятор роста растений на основе кремния (Мивал-агро).

При определении оптимального фитогормонального состава питательной среды для каллусогенеза через две недели культивирования отмечали визуальные изменения структуры и окраски донорских эксплантов. Новообразования отличались интенсивностью роста, консистенцией, окраской, морфо-генною активностью. Из сегментов гипокотилей каллус образовался равномерно по всей поверхности. На безгормональной среде MS (контроль) интенсивность роста каллуса была замедленной, на средах, модифицированных фитогормонами, интенсивность образования каллуса зависела в первую очередь от генотипа. Модифицированная среда MS, дополненная 0,5 мг/л 6-БАП, стабильно индуцировала максимальное развитие каллусной ткани (органогенного каллуса) у обоих исследованных образцов (генотипов), полученных из эсплантов гипокотиля (табл. 4).

Таблица 4 - Влияние фитогормонального состава питательных сред MS и генотипов на индукцию каллусогенеза баклажана

| Вариант | Содержание фитогормонов в вариантах опыта, мл/л | % образования каллуса | Средний объем образованных каллусов, $мм^3$ | Прирост к контролю, % |
|---|---|---|---|---|
| Линия к-3 | | | | |
| 1 | MS б/г (безгормональная среда) - контроль | 18,0 | 290,0±0,57 | - |
| 2 | MS+0,1мг/л 6-БАП | 23,0 | 300,5±0,15 | 3,62 |
| 3 | MS+0,5 мг/л 6-БАП | 61,1 | 621,42±0,83 | 114,28 |
| 4 | MS+1 мг/л 6-БАП | 31,5 | 399,33±0,51 | 37,7 |
| 5 | MS+0,1мг/л Мивал-агро | 49,8 | 478,92±0,58 | 65,14 |
| 6 | MS+0,5 мг/л Мивал-агро | 64,3 | 673,08±4,77 | 132,1 |
| 7 | MS+1 мг/л Мивал-агро | 31,2 | 345,89±0,51 | 19,27 |
| $НСР_{0,05}$ | | | | 4,86 |

| Линия к-24 | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | MS б/г (безгормональная среда) - контроль | 19,0 | 280,0±0,52 | - |
| 2 | MS+0,1мг/л 6-БАП | 24,0 | 300,5±0,15 | 7,32 |
| 3 | MS+0,5 мг/л 6-БАП | 85,7 | 738,83±0,17 | 163,57 |
| 4 | MS+1 мг/л 6-БАП | 40,0 | 508,67±0,19 | 81,67 |
| 5 | MS+0,1мг/л Мивал-агро | 33,3 | 398,83±0,11 | 42,44 |
| 6 | MS+0,5 мг/л Мивал-агро | 80,0 | 710,92±0,23 | 153,9 |
| 7 | MS+1 мг/л Мивал-агро | 61,6 | 610,5±0,15 | 118,04 |
| $НСР_{0,05}$ | | | | 4,91 |

Максимальный процент эксплантов у Линии к-3 и Линии к-24, образовавших каллус получен на средах «MS+0,5 мг/л 6-БАП» и «MS+0,5 мг/л Мивал-агро» (61,1 % и 64,3 % соответственно).

У гипокотилей образца Линия к-3 максимальный средний объем образованных каллусов (673,08±4,77 мм3) отмечали на среде, «MS+0,5 мг/л Мивал-агро» и «MS+0,5 мг/л 6-БАП» - 621,42 ± 0,83 $мм^3$.

У Линии к- 24 максимальный средний объем образованных каллусов был несколько больше (738,83±0,17 $мм^3$) на среде «MS+0,5 мг/л 6-БАП». На среде «MS+0,5 мг/л Мивал-агро» средний объем образованных каллусов составил 710,92±0,23 $мм^3$, что выше, чем у Линии к-3. Это свидетельствует о влиянии генотипа на индукцию каллусогенеза. Питательные среды «MS+0,5 мг/л 6-БАП» и «MS+0,5 мг/л Мивал-агро» обеспечили надежную индукцию каллусогенеза от 61,1 % до 85,7 % и являются наиболее эффективными для микроклонирования баклажана.

Наилучшие параметры каллусной ткани были получены на питательных средах, модифицированных фитогормонами 6-БАП и Мивал-агро в концентрациях 0,1 и 0,5 мг/л (табл. 5). Каллус был рыхлым, но структурированным кремово-зеленого и светло-зеленого цвета с центрами зачатков будущих ростков, что дало возможность сделать выводы об органогенном типе развития каллусов баклажана, индуцированных с эксплантов гипокотиля.

Таблица 5 - Влияние фитогормонального состава питательных сред MS на структуру, окраску каллуса баклажана

| Вариант | Содержание фитогормонов в вариантах опыта, мл/л | Структурный тип | Окраска |
|---|---|---|---|
| Линия к-3 | | | |
| 1 | MS б/г (безгормональная среда) - контроль | плотный | белый |
| 2 | MS+0,1мг/л 6-БАП | рыхлый | светло-зеленый |
| 3 | MS+0,5 мг/л 6-БАП | структурный | светло-зеленый |
| 4 | MS+1 мг/л 6-БАП | плотный | белый |
| 5 | MS+0,1мг/л Мивал-агро | рыхлый | светло-зеленый |
| 6 | MS+0,5 мг/л Мивал-агро | структурированный | светло-зеленый |
| 7 | MS+1 мг/л Мивал-агро | плотный | белый |
| Линия к-24 | | | |
| 1 | MS б/г (безгормональная среда) - контроль | плотный | белый |
| 2 | MS+0,1мг/л 6-БАП | структурированный | светло-зеленый |
| 3 | MS+0,5 мг/л 6-БАП | структурированный | кремово-зеленый |
| 4 | MS+1 мг/л 6-БАП | плотный | белый |
| 5 | MS+0,1мг/л Мивал-агро | рыхлый | белый |
| 6 | MS+0,5 мг/л Мивал-агро | рыхлый | желтый |
| 7 | MS+1 мг/л Мивал-агро | водянистый | стекловидный |

Отмечали наличие ярко выраженной антоциановой окраски через три недели культивирования. Это следует рассматривать как четкий признак необходимости проведения следующего этапа (пересадки на свежую питательную среду).

По литературным данным процессу ризогенеза у баклажан способствует индолилуксусная кислота (ИУК). По результатам исследованийотмечали образование ризогенного каллуса только на безгормональной питательной среде (табл. 6).

Таблица 6 - Влияние фитогормонального состава индукционных питательных сред MS на интенсивность роста каллуса баклажана разных генотипов

| Вариант | Содержание фитогормонов в вариантах опыта, мл/л | Морфогенные реакции | Интенсивность роста |
|---|---|---|---|
| Линия к-3 | | | |
| 1 | MS б/г (безгормональная среда) - контроль | ризогенез | замедленная |
| 2 | MS+1 мг/л ИУК | каллусогенез | середняя |
| 3 | MS+2 мг/л ИУК | каллусогенез, частичный ризогенез | середняя |
| 4 | MS+1 мг/л ИУК +0,5л 6-БАП | каллусогенез | замедленная |
| 5 | MS+1 мг/л ИУК+1 мг/л 6-БАП | каллусогенез | замедленная |
| 6 | MS+2 мг/л ИУК+0,5л 6-БАП | каллусогенез | замедленная |
| 7 | MS+2 мг/л ИУК+1 мг/л 6-БАП | каллусогенез | замедленная |
| Линия к-24 | | | |
| 1 | MS б/г (безгормональная среда) - контроль | ризогенез | замедленная |
| 2 | MS+1 мг/л ИУК | каллусогенез | середняя |
| 3 | MS+2 мг/л ИУК | каллусогенез, частичный ризогенез | середняя |
| 4 | MS+1 мг/л ИУК +0,5л 6-БАП | каллусогенез | середняя |
| 5 | MS+1 мг/л ИУК+1 мг/л 6-БАП | каллусогенез | середняя |
| 6 | MS+2 мг/л ИУК+0,5л 6-БАП | каллусогенез | середняя |
| 7 | MS+2 мг/л ИУК+1 мг/л 6-БАП | каллусогенез | середняя |

Частичный ризогенез наблюдали на питательной среде «MS+2 мг/л ИУК» и каллусогенез с четкими морфо-генными зонами. На всех остальных питательных средах с добавлением ауксинов происходил только каллусогенез.

**Определение условий адаптации растений-регенерантов баклажана к условиям *in vivo***

Исследователями из разных стран доказано, что наиболее критическим периодом выращивания растений *in vitro.* считается их пере-

садка из пробирок в нестерильные условия выращивания - в почву. Поэтому очень актуальной остается разработка мероприятий, обеспечивающих высокое приживление размноженного методами биотехнологии растительного материала.

Растения-регенеранты, которые сформировали корневую систему (1-2 см) и образовали 2-3 пары настоящих листьев для первичной адаптации, были пересажены в сосуды, которые содержали различные типы субстратов.

При адаптации наименьший процент приживления пробирочных растений наблюдали в опыте в варианте, где кассеты были заполнены черноземом типичным (табл. 7), на котором общая приживаемость после 3 недель адаптации составила 70 %. Это объясняется тем, что чернозем типичный, является достаточно плотным по структуре, а регенеранты баклажана на первом этапе требуют высокую аэрацию почвы и корневой системе необходимо много кислорода.

Таблица 7 - Жизнеспособность и биометрические параметры пробирочных растений баклажана после первичной адаптации

| Субстраты | Живых растений (%) | | | Биометрические показатели растений-регенерантов через три недели адаптации | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Высота | | Длина наибольшего листа | | Длина корней | |
| | 1 неделя | 2 недели | 3 недели | см | ± к контролю, см | см | ± к контролю, см | см | ± к контролю, см |
| Чернозем типичный (контроль) | 95 | 80 | 70 | 9,5 ± 1,3 | - | 4,1 ± 0,3 | - | 4,7 ± 1,1 | - |
| Торфяная смесь | 100 | 100 | 99 | 10,3 ± 1,2 | +0,8 | 6,4 ± 0,3 | +2,3 | 7,1 ± 1,4 | +3,6 |
| $НСР_{05}$ ... | | | | 2,6 | | 1,1 | | 1,5 | |

После окончания первичной адаптации показал, что в кассетах с черноземом типичным высота пробирочных растений составила 9,6 ± 1,2 см. В кассетах с торфяной смесью наблюдалась тенденция некоторого увеличения высоты растений, хотя разность показателей была в пределах ошибки опыта. Корневая система у растений-регенерантов в кассетах с черноземом типичным развивалась хуже, чем при адаптации

в торфяной смеси. В варианте с использованием торфяной смеси получены высокие параметры развития надземной части растений (побеги, листья) и корневой системы, что позволяет рекомендовать этот субстрат для первичной адаптации баклажана.

Максимальная приживаемость пробирочных растений баклажана (99 %) зафиксировано при адаптации их в субстрате из грунта торфяного универсального «Агробалт», содержащего 20 % перлита.

Все адаптированные в условиях зимней теплицы растения баклажана, относящихся к разным подвидам, достигшие высоты 14-16 см, с 3-4 парами настоящих листьев и развитой корневой системой, пересаживали в сосуды, увеличивая площадь для развития корневой системы.

Отмечали незначительное увеличение показателя «высота растения» у регенерантов, культивированных на среде «MS+0,5л 6-БАП (6-бензиламинопурина)». Что касается генеративной фазы развития, то первыми в фазу цветения и плодоношения вступили растения, культивированные на среде «MS+0,5 мг/л Мивал-агро» (табл. 8).

Таблица 8 - Изменчивость биометрических показателей растений регенерантов

| Линия | Среда | Высота растения, см | | Боковых ветвей, штук | | Листьев, штук | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 27.12.17 | 11.01.18 | 27.12.17 | 11.01.18 | 27.12.17 | 11.01.18 |
| К-3 | б/г | 36 | 46 | 2 | 3 | 24 | 27 |
| К-13 | б/г | 35 | 47 | 2 | 3 | 18 | 29 |
| К-24 | б/г | 27 | 37 | 2 | 3 | 17 | 25 |
| К-27 | б/г | 43 | 50 | 4 | 5 | 24 | 25 |
| К-3 | 0,5 БАП | 31 | 39 | 1 | 2 | 10 | 14 |
| К-24 | 0,5 БАП | 41 | 50 | 1 | 3 | 11 | 21 |
| К-27 | 0,5 БАП | 46 | 47 | 1 | 3 | 21 | 24 |
| К-13 | 0,5 М | 35 | 40 | 2 | 2 | 14 | 18 |

Биометрические показатели вегетативной фазы развития зависели, прежде всего, от генотипа линий. Приживаемость пробирочных растений исследуемых образцов, западно-азиатского сортотипа составляла 98,8 % - 99,9 %, а у образцов восточноазиатского сортотипа 90,9 % - 93,9 % (табл. 9).

Таблица 9 - Влияние генотипов пробирочных растений баклажана (R1) на рост и развитие растений

| Генотип | Приживаемость, % | Высота, см | Плодов, шт. | Масса плода, г | Урожайность | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | плодов, кг/ м$^2$ | семян, г/ м$^2$ |
| Восточноазиатский | 90,9 | 60,6 ± 3,2 | 8,2 ± 0,7 | 145,7 ± 6,3 | 4,9 | 6,7 |
| Западно-азиатский | 98,8 | 63,1 ± 5,5 | 6,1 ± 1,4 | 242,3 ± 7,1 | 6,7 | 9,4 |
| Восточно-азиатский | | 61,2 ± 2,2 | 7,1 ± 0,7 | 156,4 ± 6,4 | 5,1 | 6,8 |
| Западно-азиатский | 99,9 | 66,1 ± 4,5 | 5,2 ± 1,3 | 257,2 ± 6,6 | 6,5 | 10,3 |
| $НСР_{05}$ | | | | | 1,8 | 3,7 |

Высота пробирочных растений R1, западно-азиатского подвида была несколько выше, чем у восточноазиатского, что полностью соответствует морфологическому описанию соответствующих сортотипов. Морфологические параметры растений полученных *in vitro* были идентичными растениям, выращенным традиционным способом. Урожайность плодов из пробирочных растений баклажана составила у сортотипа восточноазиатского 4,9-5,1 кг/м$^2$.

У сортотипа западно-азиатского она была на уровне 6,5-6,7 кг/м$^2$. Выход семян баклажана был более высоким у сортотипа западно-азиатского по сравнению сортотипом восточноазиатским – 9,4-10,3 г/м$^2$.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Из девяти режимов стерилизации для культуры баклажан оптимальным является режим с использованием в качестве стерилизатора гипохлорита натрия в концентрации 2,6 % с продолжительностью экспозиции 15 минут, который позволяет получить до 69,5 % жизнеспособных эксплантов.

2. При оценке влияния испытуемых температурных режимов культивирования (фактор В) на инициацию прорастания семян различных сортовых генотипов баклажана (фактор А) выявлена статистическая значимость всех факторов, а также влияние их взаимодействия на конечный признак - инициацию прорастания семян. При этом сила влияния взаимодействия факторов (фактор АВ) оказалась наибольшей - 74%.

3. Максимальное количество образования нормальных проростков зафиксировали на второй и третьей неделе с момента проращива-

ния семян. Поздно образованные проростки (на шестой неделе проращивания семян) были аномальными, и при дальнейшем культивировании не формировали нормально развитых растений-регенерантов.

4. Процент прорастания семян баклажана в условиях переменных температур на модифицированных питательных средах увеличился несколько больше, в сравнении с безгормональной средой MS, однако на модифицированных средах увеличилось и количество инфицированности питательной среды.

5. Наиболее подходящей для прорастания семян баклажана в условиях *in vitro* является питательная среда обогащенная 0,5 мг/л Мивал-агро или 6-бензиламинопурина, на которой получен максимальный процент проросших семян, достоверно выше, чем на безгормональной среде MS.

6. Выявлено, что из сегментов гипокотилей каллус образовывался равномерно по всей поверхности. На безгормональной среде MS (контроль) интенсивность роста каллуса была замедленной, на средах модифицированных фитогормонами интенсивность образования каллуса зависела в первую очередь от генотипа.

7. Установлено, что питательные среды «MS+0,5 мг/л 6-БАП» и «MS+0,5 мг/л Мивал-агро» обеспечили надежную индукцию каллусогенеза от 61,1 до 85,7 % и являются наиболее эффективными для микроклонирования. Наилучшие параметры каллусной ткани получены на питательных средах, модифицированных фитогормонами 6-БАП и Мивал-агро в концентрациях 0,1 и 0,5 мг/л.

8. Выявлена характерная особенность каллусов баклажана – проявление ярко выраженной антоциановой окраски. Это следует рассматривать как четкий признак необходимости проведения следующего этапа (пересадки на свежую питательную среду).

9. Образование ризогенного каллуса у баклажан происходит на безгормональной питательной среде. Частичный ризогенез наблюдали на питательной среде MS+2 мг/л ИУК с каллусогенезом и четкими морфо-генными зонами, что дает возможность рекомендовать эту питательную среду для обеспечения корнеобразования у регенерантов.

10. Выявлено, что максимальная приживаемость пробирочных растений баклажана (99 %) зафиксирована при адаптации их в субстрате из грунта торфяного универсального «Агробалт», содержащего 20% перлита. В варианте с использованием торфяной смеси получены высокие параметры развития надземной части растений (побеги, листья) и корневой системы, что позволяет рекомендовать этот субстрат для первичной адаптации баклажана Высокая стерильность, гидрофильность и влагоемкость смеси позволяет ему занимать лидирующие

позиции среди субстратов для адаптации пробирочных растений.

11. Урожайность плодов из пробирочных растений баклажана составила у сортотипа восточноазиатского 4,9-5,1 кг/м$^2$. У западно-азиатского сортотипа она была на уровне 6,5-6,7 кг/м$^2$. Выход семян баклажана был более высоким у сортотипа западно-азиатского по сравнению восточноазиатским сортотипом – 9,4-10,3 г/м$^2$.

12. Разработана эффективная технология регенерационной системы для проведения клеточной селекции баклажана, которая включает использование как первичных эксплантатов семядолей семидневных проростков баклажана, сбалансированное по составу питательной среды MS для индукции каллусогенезу и образования растений-регенерантов, первичную адаптацию пробирочных растений к нестерильным условиям и оптимальные субстраты для высадки адаптированных пробирочных растений в теплицу.

13. Созданы перспективные линии баклажана и передан в Государственное сортоиспытание сорт «Снежная лавина».

14.Уровень рентабельности при выращивании нового сорта баклажана Снежная лавина составил 468 %.

## РЕКОМЕНДАЦИИ

Метод микроклонального размножения у баклажана экономически целесообразен, так как имеет ряд преимуществ - позволяет быстро получать из соматических тканей генетические копии определенного исходного растения, проводить их размножение в течение года в лабораторных условиях и повысить эффективность селекционного процесса на 30 % с сокращением времени на создание сорта до 4-5 лет.

При размножении ценных линий баклажана в условиях in vitro методом микроклонального размножения рекомендуется использовать:

- в качестве стерилизатора гипохлорит натрия в концентрации 2,6 % с продолжительностью экспозиции 15 минут, который позволяет получить до 69,5 % жизнеспособных эксплантов;

- для проращивания семян в условиях in vitro питательную среды «MS+0,5 мг/л 6-БАП» и «MS+0,5 мг/л Мивал-агро», для получения максимального процента проросших семян с проращиванием семян баклажана в условиях переменных температур и обеспечивающие надежную индукцию каллусогенеза от 61,1 % до 85,7 %.

Для обеспечения 99-100 % приживаемости пробирочных растений баклажана при первичной адаптации следует применять торфяную смесь, состоящую из азота (N) – общего – 150 мг/л; фосфора (P2O5) - 150 мг/л; калия (K2O) - 250 мг/л; магния (Mg) - 30 мг/л; кальция (Ca) -

120 мг/л. + микроэлементов. Смесь должна содержать не менее 20 % перлита. Для обеспечения пробирочных растений на первых этапах адаптации элементами питания - необходимо проводить некорневую подкормку макро - и микроэлементами, путем опрыскивания листьев питательным раствором.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ, ОТРАЖАЮЩИХ ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в издания, рекомендованных ВАК РФ

1. Аль-Дейени, М. Н. М. Создание исходного материала для селекции перца сладкого и баклажана / О. Н. Шабетя, Н. В. Коцарева, М. Н. М. Аль-Дейени, Д. А. Шеенко // Инновации в АПК: Проблемы и перспективы, 2017. - № 3 (15). - С.126-138.

2. Аль-Дейени, М. Н. М. Определение параметров адаптации растений-регенерантов баклажана к условиям in vivo для ускоренного размножения ценных линий / О. Н. Шабетя, Н. В. Коцарева, М. Н. М. Аль-Дейени, Д. А. Шеенко // Инновации в АПК: Проблемы и перспективы, 2018. -№ 4 (20) – С. 161-168.

### Публикации в других изданиях

3. Aldanyyen M. N. The conditions of adaption of eggplant regenerate (Solanum melongena l.) underin-vitro end In-vivo conditions / Kotsareva N. Viktorovna, Shabetnya O. Nicolaevna and Aldanyyen M. Nasser // International Journal of Plant Research, 2019. - №1. – vol. 9. - P.785-790.

4. Aldanyyen, M. Nasser, Biochemical composition of eggplant and its change during storage / O.N. Shabetya, N.V. Kotsareva, Aldanyyen M. Nasser, A.G. Katskaya and A.A.H. Al-Maidi // International Journal of Plant Research, 2020 - Vol. 20. – C.385-388.

5. Аль-Дейени, М. Н. М. Оптимизация питательной среды для ускоренного размножения in vitro ценных линий баклажана / Н. В. Коцарева, О. Н. Шабетя, М. Н. М. Аль-Дейени // Биотехнология, генетика, селекция в лесном и сельском хозяйстве, мониторинг экосистем / Материалы международной научно-технической конференции 21-22 июня. – Воронеж, 2017. – С. 11-18.

6. Аль-Дейени, М. Н. М. Оценка исходных линий баклажана / О. Н. Шабетя, Н. В. Коцарева, Д. А. Шеенко, М. Н. М. Аль-Дейени // Сборник материалов 1 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященный 140-летию НИУ

БелГУ и 100-летию со дня рождения селекционера, ученого и педагога, доктора с.-х. наук, профессора Щелоковой Зои Ивановны. – г. Белгород, 24-26 ноября 2016 года. – Белгород: Издательский дом «Белгород», 2017. – С. 198-199.

7. Аль-Дейени, М. Н. М. Оптимизация питательной среды для ускоренного размножения ценных линий баклажана *in vitro* / Н. В. Коцарева, О. Н. Шабетя, М. Н. М. Аль-Дейени // Международная научно-практическая конференция: Современные проблемы адаптации (Жученковские чтения IV), 24–26 сентября 2018 г. – Белгород: НИУ «БелГУ», 2018.

8. Аль-Дейени, М. Н. М. Размножение линий баклажана микроклональным методом / О. Н. Шабетя, Н. В. Коцарева, М. Н. М. Альденией, Д. А. Шеенко // Инновационные решения в аграрной науке – взгляд в будущее: Материалы XXIII международной научно-производственной конференции «Инновационные решения в аграрной науке – взгляд в будущее». Белгород, 2019. - С. 8.

9. Аль-Дейени, М. Н. М. Изучить состав питательных сред для регенерации культуры баклажана / М. Н. М. Альденией // Сборник статей XVII Международной научно-практической конференции: Фундаментальные и прикладные научные исследования: Актуальные вопросы, достижения и инновации, 15 ноября 2018 г., Пенза. – Ч. 1. - С.99-101.

10. Аль-Дейени, М. Н. М. Определить условия адаптации растений-регенерантов баклажана к условиям *in vivo* / М. Н. М. Аль-Дейени // Сборник статей XVII Международной научно-практической конференции: Фундаментальные и прикладные научные исследования: Актуальные вопросы, достижения и инновации, 15 ноября 2018 г., Пенза. – Ч. 1. -С.105-107.