

## БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 581.143.6:634.334

DOI: 10.17072/1994-9952-2018-1-57-61.

**Н. Л. Шибанова, М. В. Орлова**

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

### МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *CITRUS LIMON* (L.) OSBECK СОРТА ПАВЛОВСКИЙ

Представлены результаты по клональному микроразмножению *Citrus limon* L. Osbeck сорта Павловский. Установлено, что для стерилизации эксплантов наиболее подходящим является следующий порядок использования стерилизующих агентов: 96% этанол (5 сек.) и 8% раствор гипохлорита натрия (20 мин.). Выход стерильной культуры составил 70%. Для введения лимона сорта Павловский в культуру *in vitro* оптимальной оказалась твердая питательная среда MS с добавлением 1.0 мг/л бензиламинопурина и 0.5 мг/л нафтилуксусной кислоты. Выход жизнеспособных эксплантов составил 77.5%. Культивирование микропобегов проводилось на среде DKW с добавлением фитогормонов 2.0 мг/л бензиламинопурина и 2.0 мг/л гиббереллиновой кислоты. С каждого материнского экспланта удалось получить  $2.45 \pm 0.78$  дочерних микропобега. Оптимальной для ризогенеза регенерантов является среда  $\frac{1}{2}$  MS с добавлением 1.0 мг/л нафтилуксусной кислоты и 1.0 мг/л индолилуксусной кислоты. Процент укорененных микропобегов составил 65.1. Растения, полученные в культуре *in vitro*, были перенесены в условия закрытого грунта в почвенный субстрат: торф, перлит, вермикулит, песок в соотношении 7:2:3:2. Приживаемость растений составила 87.5%.

**Ключевые слова:** микроклональное размножение; *Citrus limon* (L.) Osbeck; регуляторы роста.

**N. L. Shibanova, M. V. Orlova**

Perm State University, Perm, Russian Federation

### MICROCLONAL PROPAGATION *CITRUS LIMON* (L.) OSBECK CULTIVAR PAVLOVSKY

There is the results of clonal micropropagation of *Citrus limon* L. Osbeck of Pavlovsky variety. It was established that the following procedure of the use of sterilizing agents is most suitable for the sterilization of explants: 96% ethanol (5 sec) and 8% sodium hypochlorite solution (20 min). The yield of the sterile culture was 70%. It was found that the solid MS nutrient medium with the addition of 1.0 mg/l benzylaminopurine and 0.5 mg/l naphthylacetic acid was optimal to introduce the lemon Pavlovsky into the culture *in vitro*. The yield of viable explants was 77.5%. Cultivation of microshoots was carried out on DKW medium with the addition of phytohormones 2.0 mg/l benzylaminopurine and 2.0 mg/l gibberellic acid.  $2.45 \pm 0.78$  child microshoots was get from each parental explant. Optimum for rhizogenesis of regenerants is medium  $\frac{1}{2}$ MS with addition of 1.0 mg/l naphthylacetic acid and 1.0 mg/l indolyacetic acid. The percentage of rooted microshoots was 65.1. Plants obtained from *in vitro* culture were transferred to conditions of closed soil in the soil substrate: peat, perlite, vermiculite, sand in a ratio of 7:2:3:2. Plant survival was 87.5%.

**Key words:** microclonal propagation; *Citrus limon* (L.) Osbeck; growth regulators.

#### Введение

Лимон является одной из важнейших сельскохозяйственных культур, которая все больше пользуется потребительским спросом на рынке. Его плоды богаты эфирными маслами, органическими кислотами, витаминами А, В, С, Р и могут использоваться в кондитерской, парфюмерной, консерв-

ной отраслях [Капцинель, 1953; Егорова, 1981; FAO, 2013].

Климатические условия нашей страны не являются подходящими для разведения лимона, так как оптимальная температура для вегетационного периода составляет  $+20 \dots +22^\circ\text{C}$  [Самарина, Коломиец, 2009]. Однако с каждым годом увеличивается число любителей-цитрусоводов, среди которых наибольшей популярностью пользуются сорта

Павловский, Уральский, Майкопский.

Для получения качественных и здоровых сеянцев может быть использован метод микроклонального размножения, который имеет немало преимуществ перед традиционными способами размножения. К таким преимуществам относятся высокий коэффициент размножения, возможность работать вне зависимости от времени года, получение генетически однородного потомства и безвирусной базы, ювенилизация посадочного материала, которая является важной для адаптации к условиям *in vivo* [Сорокина, Старичкова, Решетникова, 2002; Черевченко, Лаврентьева, Иванников, 2008; Самарина, 2013].

Цель данной работы – оптимизация этапов микроклонального размножения лимона сорта Павловский.

### Материал и методы исследования

Исследования проводились в 2017 г. в лаборатории микроклонального размножения кафедры ботаники и генетики растений и в Учебном ботаническом саду Пермского государственного национального исследовательского университета (ПГНИУ).

В качестве первичных эксплантов были использованы пазушные вегетативные почки лимона сорта Павловский с частью стебля длиной 1.3–2.2 см. Стерилизацию материала проводили следующим образом: раствор нейтрального детергента (25 мин.); промывка проточной водой (15 мин.); 96% этанол (5 сек.); 8% раствор гипохлорита натрия (20–30 мин.), с последующей промывкой в трех сменах стерилизованной дистиллированной воды (по 5 мин. в каждой).

На этапе введения в культуру и адаптации экспланты высаживались на питательные среды Мурашиге и Скуга (MS) и КМО – MS с пониженным содержанием нитрата аммония (250 мг/л) без нитрата калия, но с добавлением сульфата аммония 1500 мг/л. [Murashige, Skoog, 1962], 2.5%-ной сахарозы, 0.7%-ного агар-агара. В среду добавляли регуляторы роста – нафтилуксусную кислоту (НУК), бензиламинопуриин (БАП) и витамины: тиамин, пиридоксин, никотиновую кислоту. На этапе собственно микроразмножения использовалась среда DKW [Driver, Kuniyuki, 1984] с фитогормонами БАП и ГК (гибереллиновая кислота). На этапе укоренения микропобеги помещали на среду 1/2 MS с добавлением ауксинов – НУК 2.0 мг/л и ИУК 1.0 мг/л.

Стерилизация питательной среды проводилась в автоклаве Sanyo MLS-3780 при температуре 120°C, давлении 1 атм, в течение 15 мин. Все этапы микроразмножения проводились в стерильных условиях в ламинар-боксе. Экспланты содержали в условиях искусственного освещения (2790 люкс), период 14/10, при температуре + 20 ± 2°C. Часть растений, полученных в культуре *in vitro*, в декабре 2017 г. и в январе 2018 г. была перенесена в Учебный ботанический

сад ПГНИУ, где выращивалась в условиях закрытого грунта.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программу Microsoft Office Excel. Различия по критерию Фишера считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

### Результаты и их обсуждение

Микроклональное размножение лимона сорта Павловский проводилось в четыре этапа, выделение которых является общепринятым [Бутенко, Шевелуха, 1960].

Первый этап включал стерилизацию эксплантов и их посадку на твердую питательную среду MS. Стерилизация материала проводилась в три этапа с разной экспозицией в основном стерилизующем агенте (табл. 1).

Таблица 1

#### Выход стерильной культуры в зависимости от экспозиции в основном стерилизующем агенте

Основное стерилизующее вещество	Экспозиция, мин.	Выход стерильной культуры, %
Гипохлорит Na («Белизна»), 8%	15	49.2
	20	70.1
	25	58.4

Исходя из данных, представленных в табл. 1, можно сделать заключение, что для обработки экспланта 8%-ным раствором гипохлорита натрия необходимо не менее 20 мин. Разница с экспозицией в 15 мин. оказалась достоверной ( $p=0.04$ ,  $p<0.05$ ). Самый высокий процент выхода стерильной культуры отмечался при экспозиции 20 мин. – 70.1%. В работе О.В. Дорощенка [2016] при использовании 10%-ного раствора гипохлорита Na в течение 15 мин. наблюдался примерно такой же процент выхода стерильной культуры – 68.2.

Результаты по развитию эксплантов лимона на твердой питательной среде MS представлены в табл. 2.

Таблица 2

#### Выход жизнеспособных эксплантов на твердой питательной среде MS, %

Варианты среды	Жизнеспособные экспланты
MS+1.0 мг/л БАП+0.5 мг/л НУК	77.5
MS+1.0 мг/л НУК	63.6
MS+ 1.0 мг/л БАП	69.2
КМО+БАП 2.0 мг/л+ ГК 2.0 мг/л	47.3

При анализе результатов по развитию эксплантов лимона сорта Павловский на твердой питательной среде MS установлено, что оптимальной является среда с добавлением 1.0 мг/л БАП и 0.5 мг/л НУК, на которой получен самый высокий процент жизнеспособных эксплантов – 77.5. На

среде КМО с добавлением 2.0 мг/л БАП и 2.0 мг/л ГК наблюдался самый низкий процент выхода жизнеспособных эксплантов – 47.3. Разница между первым и четвертым вариантами среды оказалась достоверной ( $p=0.03$ ,  $p<0.05$ ). Полученные результаты отличаются от данных Л.С. Самариной [2013] по другим сортам лимона, у которых выход жизнеспособных эксплантов на среде КМО был высоким и составил 84.7%.

Начало роста микропобегов на первом варианте

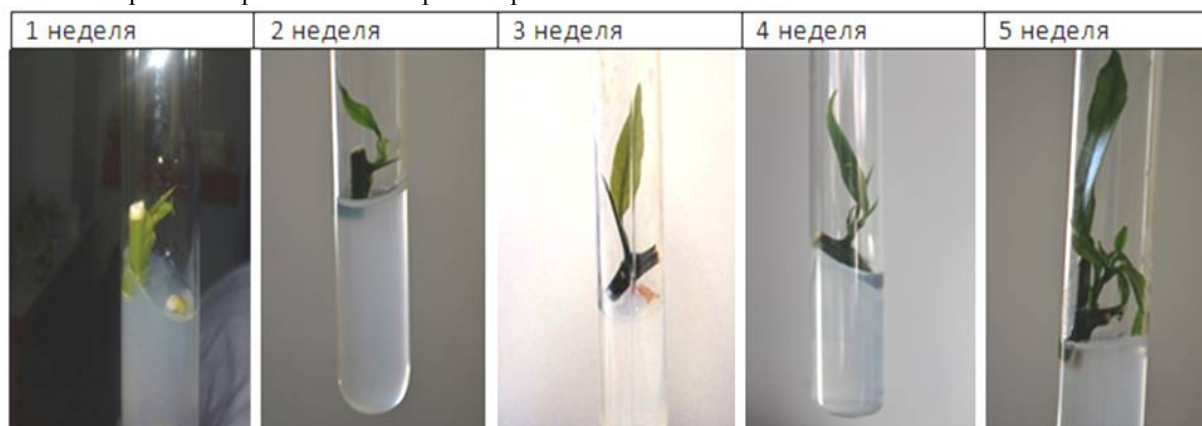


Рис. 1. Развитие экспланта лимона сорта Павловский на питательной среде MS+1.0 мг/л БАП+0.5 мг/л НУК

Вторым этапом является активация роста побегов с последующим микроразмножением. Культивирование проводилось на среде DKW с добавлением 2.0 мг/л БАП и 2.0 мг/л ГК. Через неделю наблюдалось возобновление роста, через 4–5 недель начиналось образование микропобегов. С каждого материнского экспланта удалось получить  $2.45 \pm 0.78$  дочерних микропобега.

Для укоренения микрочеренков была использована питательная среда MS с уменьшенной вдвое концентрацией минеральных солей и сахарозы ( $\frac{1}{2}$  MS), в двух вариантах: с добавлением 3.0 мг/л НУК и 1.0 мг/л НУК+1.0 мг/л ИУК. Результаты влияния ауксинов на ризогенез представлены на рис. 2.

Для оценки эффективности ризогенеза считывали частоту укоренения, то есть число корней на одном микропобеге. На первом варианте среды она составила 65.1% укорененных микропобегов с длиной корней  $3.6 \pm 0.81$  см и числом –  $2.6 \pm 0.49$  шт. на побег. На втором варианте среды наблюдалось 62.8% укорененных микропобегов с длиной корней  $4.2 \pm 1.16$  см и числом –  $1.2 \pm 0.34$  шт. на побег. В работе Л.С. Самариной [2013] для других сортов лимона наилучшей для укоренения была среда с добавлением 1.0–2.0 мг/л НУК и 1.0 мг/л ИМК. При этом процент укорененных побегов варьировал от 83.7 до 95.1. Длина корней составила 4.2–5.2 см, а число – 3.1–3.8 шт. на побег.

Растения, полученные в культуре *in vitro*, были перенесены в условия закрытого грунта Учебного ботанического сада ПГНИУ. Они были высажены

в почвенный субстрат: торф, перлит, вермикулит, песок в соотношении 7:2:3:2. Выход адаптированных растений составил 87.5%.

в почвенный субстрат: торф, перлит, вермикулит, песок в соотношении 7:2:3:2. Выход адаптированных растений составил 87.5%.

1 вариант – $\frac{1}{2}$ MS +3.0 мг/л НУК	2 вариант – $\frac{1}{2}$ MS MS+1.0 мг/л НУК+1.0 мг/л ИУК
--	---



Рис. 2. Влияние ауксинов на ризогенез микрочеренков лимона сорта Павловский

## Заключение

В результате проведенных исследований можно предложить следующую схему микроклонального размножения лимона сорта Павловский. На этапе введения в культуру можно использовать твердую питательную среду MS с добавлением 1.0 мг/л БАП и 0.5 мг/л НУК. На этапе микроразмножения хорошие результаты получены на среде DKW с

добавлением БАП 2.0 мг/л и ГК 2.0 мг/л. Для этапа укоренения предлагается питательная среда ½ MS с уменьшенной вдвое концентрацией минеральных солей и сахарозы с добавлением ауксинов 1.0 мг/л НУК+1.0 мг/л ИУК. Для перенесения в закрытый грунт можно использовать почвенный субстрат следующего состава: торф, перлит, вермикулит, песок в соотношении 7:2:3:2.

### Библиографический список

- Бутенко Р.Г., Шевелуха Е.А. Биология культивируемых клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-Пресс Москва, 1960. 152 с.
- Дорощёнок О.В. Микроразмножение двух видов рода *Citrus* L. // Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии: материалы регион. с междунар. участием студ. науч. конф. Пермь, 2016. С. 31–33.
- Егорова Т.В. Семейство рутовые (*Rutaceae*) // Жизнь растений. М.: Просвещение, 1981. Т. 5, ч. 2. Цветковые растения. С. 236–245.
- Капцинель М.А. Выращивание цитрусовых культур в Ростовской области. Ростов н/Д: Кн. изд-во, 1953. 84 с.
- Самарина Л.С. Оптимизация приёмов микроразмножения и сохранения лимона *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2013. 23 с.
- Самарина Л.С., Коломиец Т.М. Особенности микроразмножения *C. limon* в условиях *in vitro* // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: материалы IX молодеж. науч. конф. М., 2009. С. 25–26.
- Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б. Основы биотехнологии растений. Культура растительных клеток и тканей: учеб. пособие. Саратов: Изд-во СГУ, 2002. 45 с.
- Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. Киев: Наук. думка, 2008. 633 с.
- Driver J.A., Kuniyuki A.H. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock // Hort. Sci. 1984. Vol. 19. P. 507–509.
- FAO Citrus Fruit Production . Food And Agriculture Organization (FAO) Of The United Nations. FAOSTAT [Электронный ресурс]. Rome, 2013. URL: <http://faostat3.fao.org/compare/E>
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with to-bacco tissue cultures // Physiol. plant. 1962. Vol. 15. P. 473–497.
- nologii na ich osnove* [Biology of cultivated cells of higher plants *in vitro* and biotechnology on their basis]. Moscow, FBK-Press Moscow Publ., 1960. 152 p. (In Russ.).
- Cherevchenko T.M., Lavrentyeva A.N., Ivannikov R.V. *Biotehnologija tropičeskich i subtropičeskich rastenij in vitro* [Biotechnology of tropical and subtropical plants *in vitro*]. Kiev, Nauk. dumka Publ., 2008. 633 p. (In Russ.).
- Doroshenko O.V. [Micropropagation of two species of the genus *Citrus* L.]. *Fundamental'nye i prikladnye issledovaniya v biologii i ekologii* [Fundamental and applied research in biology and ecology: materials of the regional student conference with international participation]. Perm, 2016, pp. 31-33. (In Russ.).
- Driver J.A., Kuniyuki A.H. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *Hort. Sci.* V. 19 (1984): pp. 507-509.
- Egorova T.V. [Family Rutacea (Rutaceae)]. *Žizn' rastenij. Cvetkovye rastenija* [Life of plants. Flowering plants]. Moscow, Prosveščenie Publ., 1981, V. 5, p. 2, pp. 236-245. (In Russ.).
- FAO Citrus Fruit Production . Food And Agriculture Organization (FAO) Of The United Nations. FAOSTAT [Electronic resource]. Rome. 2013. Available at: <http://faostat3.fao.org/compare/E>
- Kaptsinel M.A. *Vyraščivanie citrusovych kul'tur v Rostovskoj oblasti* [Cultivation of citrus crops in the Rostov Region]. Rostov-on-Don: Knižnoe izd-vo Publ., 1953. 84 p. (In Russ.).
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with to-bacco tissue cultures. *Physiol. plant.* V. 15 (1962): pp. 473-497.
- Samarina L.S. *Optimizacija priemov mikrorazmnoženija i sochranenija limona in vitro. Avtoref. diss. kand. biol. nauk* [Optimization of micropropagation and lemon conservation methods *in vitro*. Abstract Cand. Diss.]. Moscow, 2013. 23 p. (In Russ.).
- Samarina L. S., Kolomic T.M. [Features of *C. limon* micropropagation under *in vitro* conditions]. *Biotehnologija v rastenievodstve, životnovodstve i veterinarii* [Biotechnology in crop production, animal husbandry and veterinary science. Materials of the IX youth scientific conference]. Moscow, 2009, pp. 25-26. (In Russ.).
- Sorokina I.K., Starichkova N.I., Reshetnikova T.B. *Osnovy biotehnologii rastenij. Kul'tura rastitel'nyh kletok i tkanej* [Fundamentals of plant biotechnology. Culture of plant cells and tissues]. Saratov, SSU Publ., 2002. 45 p. (In Russ.).

### References

Butenko R.G., Shevelukha E.A. *Biologija kultiviruemych kletok vysšich rastenij in vitro i biotech-*

Поступила в редакцию 06.02.2018

**Об авторах**

Шибанова Наталья Леонидовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и генетики растений

ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

**ORCID:** 0000-0002-9404-6821

614990, Пермь, ул. Букирева, 15;  
shibanova7@mail.ru; (342)2396229

Орлова Мария Вячеславовна, студентка биологического факультета

ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

**ORCID:** 0000-0002-4134-9087

614990, Пермь, ул. Букирева, 15;  
maria\_orl\_1996@mail.ru; (342)2396229

**About the authors**

Shibanova Natalya Leonidovna, candidate of biology, associate professor Department of Botany and Plant Genetics

Perm State University.

**ORCID:** 0000-0002-9404-6821

15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990;  
shibanova7@mail.ru; (342)2396229

Orlova Mariya Vyacheslavovna, student Faculty of Biology

Perm State University.

**ORCID:** 0000-0002-4134-9087

15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990;  
maria\_orl\_1996@mail.ru; (342)2396229

**Информация для цитирования:**

Шибанова Н.Л., Орлова М.В. Микроклональное размножение *Citrus limon* (L.) Osbeck сорта Павловский // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2018. Вып. 1. С. 57–61. DOI: 10.17072/1994-9952-2018-1-57-61.

Shibanova N.L., Orlova M.V. [Microclonal propagation *Citrus limon* (L.) Osbeck cultivar Pavlovsky]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 1 (2018): pp. 57-61. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2018-1-57-61.

