

***LYCIUM BARBARUM* L. (ГОЖИ) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*, СОРТ ЭРМА**

Н.Г. Чоркинэ, М.А. Табара, А.И. Кутковски-Муштук, М.И. Трофим, М.Н. Лозински

Ботанический сад (Институт) Академии наук Молдовы, Кишинев, Молдова, ninaciorchina@mail.ru

Аннотация. Для инициирования культуры *in vitro Lycium barbarum* L., сорта Эрма инокулировали меристемы и верхушечные апексы с первичными примордиями, на питательную среду (MS), дополненную повышенной концентрацией ауксинов и цитокининов ANA и BAP. На 20-25 день отмечалось увеличение пролиферации, количества побегов и их длины на один эсплант. Полученные результаты показывают, что на питательной среде для микроклонирования витропобегов, пролиферированных из меристем, наблюдались и процессы корнеобразования (ризогенез).

Ключевые слова: *витрокультура, Гожу, Lycium barbarum, питательные среды, фитогормоны*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1423-1426

Микроклонирование метод вегетативного размножения хорошо известный и зарекомендовавший себя своими теоретическими и прикладными преимуществами для регенерации некоторых видов, форм, сортов трудно размножаемых традиционными способами (семенами, черенками, прививками и т.д.) [Fira et al., 2016] Имеет своей целью быстрое микротиражирование растений, получение оздоровленного безвирусного посадочного материала, создание новых продуктивных сортов, устойчивых к различным стрессогенным физическим и химическим факторам. [Fira, Clara, 2011].

Lycium barbarum L. последние 2 десятилетия притягивает к себе живой интерес, благодаря своим терапевтическим и питательным качествам, и очевидна необходимость в разработке технологии получения посадочного материала высокого качества посредством витрокультуры, что наиболее рентабельно. В статье приводятся результаты исследований по выявлению морфогенетического потенциала у различных типов эсплантов, посредством тестирования и установления фаз и периода инициирования и введения в культуру, роста развития и укоренение в условиях *in vitro, ex vitro* на различных питательных средах, субстратах и хорошо подобранных оптимальных условий культивирования. [Hu et al., 2001].

Lycium barbarum L. чаще известен под названием гожи уже более 2000 лет в качестве крайне полезного растения Тибета сем. Solanaceae. Культивирование гожи имеет свои преимущества и большое значение с экономической точки зрения, медицинской, питания (нутриции). Среднегодовой урожай фруктов гожи свыше 6,0 т на один гектар, фрукты ценны тем, что содержат значительное количество минералов: Mg, Fe, Ca, K, Cu, Se, 18 аминокислот, Vit A, C, Vit группы B: B₂, B₆, Vit E, полисахариды, ненасыщенные жирные кислоты, каротиноиды, фитостероиды и фенолы [Donno et al., G. 2015]. Goji самый сильный антиоксидант из всех известных фруктов существующих в мире и по содержанию каротина тоже стоит на первом месте [Hu et al., 2006; Jing, Yin, 2010]. Для получения качественного посадочного материала и аргументированного внедрения его в агропромышленный сектор необходимо иметь продуктивный сорт, изученный биоморфологически, адаптированный и акклиматизированный к конкретным условиям культивирования.

Экспериментальная работа проводилась в Лаб. Эмбриологии и Биотехнологии в 2015-2017 годах, в качестве биологического материала использовали сорт Эрма,

выведенный в Аграрном Университете г. Клуж-Напока Республики (Румыния) и любезно был предоставлен нам коллегами для интродукции и инициации этого сорта в Молдове [Clara et al., 2013; Fira, Clara, 2011]. С этой целью были отобраны экспланты порядка 2,0 см в мае месяце у растений открытого грунта и из теплицы. Стерилизация осуществлялась в 2 этапа: первый этап состоял в предварительной дезинфекции в течение 15 мин. В слабом растворе $KMnO_4$ (0,05%) и несколько капель Tween-20, затем следуют 3 полоскания дистиллированной водой. Второй этап, в котором экспланты были экспонированы в стерилизующем растворе диацета 0,1% в течение 7 мин при постоянном взбалтывании, по истечении времени раствор сливали и экспланты промывали 4 раза дистиллированной, автоклавированной водой. Варианты эксперимента состояли из различных комбинаций фитогормональных регуляторов роста, входящих в состав питательных сред и в зависимости от проводимых операций:

1. Для введения в культуру *in vitro* инокулировали меристемы на базовую среду MS-100%, агаризованную и дополненную 0,5 мг/л ВАР, в пробирки диаметром 2,0 см и 20 см длиной, количество среды в каждой пробирке составляет – 15,0 мл. В пробирку инокулируют один эксплант, которая достигает 6-10 см в течение 25-30 дней.

2. Микропобеги подвергают делению на фрагменты, обычно 4-5 см, для ризогенеза на новую среду MS-100%, агаризованную или жидкую с различной концентрацией АНА и ВАР в шести опытных вариантах. Были протестированы верхушечные, средние и нижние микрочеренки с 1-2 парами листочков. Базальную часть с хорошо развитой корневой системой отправляем на *ex vitro* для укоренение (табл. 1)

3. Процесс ризогенеза миничеренков стимулировали добавлением в состав жидкой питательной среды различные варианты ауксинов АІВ и АІА (табл. 2). Контрольный вариант был безгормональный.

4. Статистические подсчеты проводились в программе Soft Excel.

Таблица 1.

Влияние различных концентраций ВАР и АНА на процесс микроклонирования *in vitro* la *Lycium barbarum* L, Murashige & Skoog 1962 (MS)

Варианты опыта	Регуляторы роста	Процент жизнеспособных инокулянтов, %	Средняя длина минипобегов, (см) ES*	Число минипобегов SE*
V1	0,2mg/l ВАР	80	3.0 ± 0.4	2.4 ± 0.2
V2	0,4mg/l ВАР	85	4.0 ± 0.3	5.4 ± 0.3
V3	0,6mg/l ВАР	90	5.0 ± 0.6	5.2 ± 0.4
V4	0,6mg/l ВАР+0,6mg/l АНА	95	6.0 ± 0.3	19.7 ± 0.5
V5	0,4mg/l ВАР+0,4mg/l АНА	75	3.5 ± 0.3	15.9 ± 0.4
V6	0,2mg/l ВАР+0,2mg/l АНА	65	2.0 ± 0.3	5.3 ± 0.4

Анализируя результаты опытов, констатируем, что вид *Lycium barbarum* L., сорт Эрма, характеризуется позитивной реактивностью апикальной меристемы в качестве биологического материала и в этом отношении отмечены питательные среды 4, 3, 2 (табл. 1)

Влияние регуляторов роста ВАР и АНА на процесс микроклонирования. Увеличение концентрации ВАР в питательной среде прямо пропорционально по отношению к длине минипобега (табл. 1) и провоцирует пролиферацию большого количества адвентивных почек, а увеличение АНА благоприятно влияет на длину микропобегов у витрокультур [Ibrahim et al., 2005].

Следует отметить: на среде, дополненной 0,6 мг/л ВАР, развиваются более 20 адвентивных минипобегов, на варианте с концентрацией 0,4 мг/л ВАР имеем 15

мини побегов, концентрация 0,2 мг/л ВАР дает только 6 мини побегов.

Влияние сахарозы на рост и развитие мини побегов. Для удешевления посадочного материала и оптимизации сред сахарозу заменили на продовольственный сахар, что оказалось эффективным и рентабельным. Сахар в концентрации 30 г/л приводит к мощному развитию мини побегов, у которых наблюдаем яркий блестящий цвет листьев. За период порядка 30 дней на среде с повышенной дозой сахара мини побеги достигают более 6 см в длину, на 2 см больше по сравнению с контролем и на 3 см по сравнению с вариантом 15,0 г/л сахара [Kuria et al., 2008].

Ризогенез *in vitro*. Для развития корневой системы у витрокультур была протестирована жидкая питательная среда М-S-100% в семи вариантах, результаты этих исследований представлены в табл. 2. Из всех сред следует отметить питательную среду V-6 – М-S-100%б дополненную 1,0 мг/л АІВ, как наиболее оптимальную и адекватную на которой 93% мини побегов образуют развитую корневую систему. На 14 день наблюдаем появление корешков, а на 20-30 день витрокультура достигает развития, когда может быть использована в качестве биологического материала для микро черенкования. В норме побег для черенкования достигает в длину 10-12 см, из него обычно получаем 4-5 микро черенков 2,0-2,2 см каждый.

Таблица 2.

Способность корнеобразования мини побегов полученных *in vitro* из эксплантов культивируемых на питательной среде MS дополненной АІА și АІВ

Варианты опыта	Регуляторы роста (mg/l)		Процент ризогенеза, %	Число развитых корешков, (SE)**
	АІА	АІВ		
V1	00	00	23	1.0 ± 0.12
V2	0.5	-	60	2.3 ± 0.37
V3	1.0	-	70	3.2 ± 0.38
V4	2.0	-	73	5.6 ± 0.38
V5	-	0.5	54	4.3 ± 0.36
V6	-	1.0	93	8.3 ± 0.87
V7	-	2.0	70	6.3 ± 0.36

Процесс перевода витрокультуры из условий *in vitro* и *ex vitro*. Следует отметить, что процесс формирования корневой системы протекает без особых трудностей. Для *ex vitro* тоже характерна хорошая приживаемость при адекватном субстрате, влажности и температуре и составляет 90-95%. Процедура перевода транспланта осуществляется следующим образом: растения извлекают из пробирки, промывают от остатков питательной среды в слабом растворе 0,05% КМnO₄, при этом корешки при необходимости укорачивают, после чего растения сажают в субстрат, составляющие которого – торф и песок в пропорции 1:1, рН5,5-5,8, песок речной, тщательно промытый. Посадка проводится в специальные ячеистые паллеты, которые первую неделю укрывают прозрачными каркасами, для поддержания влажности, проветривание растений проводится 2-3 раза в день и при необходимости увлажняется субстрат пульверизатором. По истечении 7-10 дней каркас убирают и еще 15 дней растения могут быть пересажены в паллеты с ячейками большего диаметра или вегетационные сосуды в субстрат, состоящий из чернозема, песка, перлита и листовой почвы.

Анализируя, полученные результаты, сопоставляя их с литературными данными [Fira et al., 2016; Jing, Yin, 2010], можем утверждать, что данный метод, оптимизированный и апробированный нашими исследованиями, может быть использован для получения качественного посадочного материала для промышленных плантаций.

Литература

- Clapa D., Fira A., Joshee N. An Efficient *ex vitro* rooting and acclimatization method for horticultural plants using float hydroculture // Hortscience. – 2013. – V. 48. – P. 1159–1167.
- Donno D., Beccaro G.L., Mellano M.G., Cerutti A.K., Bounous G. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation // J. Funct. Food. – 2015.
- Fira A., Clapa D. Results regarding *in vitro* proliferation in goji (*Lycium barbarum*) // Bulletin UASVM Horticulture. – 2011. – V. 68 (1). – 503 p.
- Fira A., Joshee N., Cristea V., Simu M., Hârța M., Pamfil D., Clapa D. Optimization of micropropagation protocol for goji berry (*Lycium barbarum* L.) // Bulletin UASVM Horticulture. – 2016. – V. 73 (2). – DOI:10.15835/buasvmcn-hort:12177.
- Hu Z., G.-Q. Guo, D.-L. Zhao, L.-H. Li, G.-C. Zheng. Shoot regeneration from cultured leaf explants of *Lycium barbarum* and agrobacterium-mediated transformation // Russian Journal of Plant Physiology. – 2001. V. 48 (4). – P 453–458.
- Hu Z., Hu Y., Gao H-H., Guan X-Q., Zhuan D-H. Callus production, somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lycium barbarum* root explants // Biol. Plantarum. – 2008. – V. 52. – P. 93–96
- Hu Z., Wu Y-R., Li W., Gao H-H. Factors affecting agrobacterium tumefaciens – mediated genetic transformation of *Lycium barbarum* L. – *In Vitro Cell Dev-Pl.* – 2006. – V. 42. – P. 461–466.
- Ibrahim K.M., Kazal M.A., Rasheed K.I. Alternative gelling agents for potato tissue culture applications // Majalah Al-Istitsmary Al-Zara'y. – 2005. – V. 3. – P. 80–83.
- Jing L., L. Yin. Antihyperglycemic activity of polysaccharide from *Lycium barbarum* // Journal of Medicinal Plants Research. – 2010. – V. 4 (1). – P. 23–26.
- Kuria P., Demo P., Nyende A.B., Kahangi E.M. Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the *in vitro* micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). – Afr. J. Biotechnol. – 2008. – V. 7. – P. 301-307.

LYCIUM BARBARUM L. (GOJI) IN VITRO ORGANOGENESIS THE ERMA VARIETY

N.G. Ciorchină, M.A. Tabara, A.I. Cutcovschi-Muștuc, M.I. Трофим, M.P. Lozinschi

Botanical Garden of the Academy of Sciences of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova, ninaciorchina@mail.ru

Abstract. For the initiation of *in vitro* of goji, shoot apex pieces, inoculated in cultura medium Murashige-Scoog (MS), supplemented with hormones of different concentration ANA and BAP. When higher doses of ANA and BAP were used, there was proliferation of shoots and an increase in their length in the Erma variety. The experiments aimed at determining the rooting capacity of plantlets *in vitro* were organized depending on the culture medium. Thus, irrespective of the combination and concentration of growth, it had a positive influence on the rooting capacity of the shoots

Keywords: organogenesis, medium nutrition, *in vitro*, growth regulators, variety