

# СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ЦЕННЫХ ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЙ

О. И. МОЛКАНОВА, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник (e-mail: molkanova@mail.ru)

О. В. КОРОЛЕВА, младший научный сотрудник  
Т. С. СТАХЕЕВА, младший научный сотрудник  
И. Л. КРАХМАЛОВА, младший научный сотрудник  
Е. А. МЕЛЕЩУК, инженер

Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина РАН, ул. Ботаническая, 4, Москва, 127276, Российская Федерация

**Резюме.** Оптимизированы приемы культивирования перспективных плодовых и ягодных культур *in vitro* для использования в условиях промышленного выращивания. Исследования проводили в 2012–2018 гг. на перспективных сортах жимолости, аронии, вишни, малины, ежевики, рябины, крыжовника, актинидии и голубики. В качестве инициальных эксплантов использовали меристемы апикальных и латеральных почек и апексы побегов. Этап инициации осуществляли на среде MS (Murashige and Skoog) с 6-BAP (6-Benzylaminopurine, 0,3...0,5 мг/л), пролиферации – на модифицированной среде MS и QL (Quorin and Lepoivre) с добавлением сахарозы или глюкозы (30 г/л) и 6-BAP (0,2...2,0 мг/л) и IAA (Indole-3-acetic acid, 0,01...0,10 мг/л). Представителей семейства Ericaceae культивировали на среде Андерсона с IAA и 2 iP (N6-(2-Isopentenyl)adenine) в соотношении 1:5 и 4:15. На этапе укоренения использовали среду MS с IAA и IBA (Indole-3-butyric acid, 0,5...1,5 мг/л). Опыт проводили в 3-х повторностях, в каждой отбирали не менее 30 эксплантов. Определяющее влияние на реализацию растениями их морфогенетического потенциала оказывали генетические особенности, по сравнению с влиянием регуляторов роста (например, у актинидии коломикта 49 и 24 % соответственно). Большинство эксплантов лучше развивались на минеральной основе питательной среды QL, чем на MS. Так, усорта жимолости Принцесса Диана коэффициент размножения повысился с 35,7 до 48,5. У большинства объектов на этапе пролиферации коэффициент размножения увеличивался при использовании в качестве источника углеводного питания глюкозы и совместного применения цитокининов и ауксинов в качестве регуляторов роста. Так, у представителей рода *Lonicera* он повысился с 3,1 до 37,8. Оптимальный субстрат для адаптации растений-регенерантов к условиям *ex situ* – мох-сфагнум. Микроорганизмы отличались высокими темпами роста и развития, имели большую высоту (до 10%), по сравнению с регенерантами, укореняемыми *in vitro*.

**Ключевые слова:** клональное микроразмножение, плодовые и ягодные культуры, питательные среды, генетический банк *in vitro*.

**Для цитирования:** Совершенствование технологии клонального микроразмножения ценных плодовых и ягодных культур для производственных условий / О. И. Молканова, О. В. Королева, Т. С. Стахеева и др. // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. № 9. С. 66–69. DOI: 10.24411/0235-2451-2018-10915.

Плодовые и ягодные культуры имеют важное хозяйственное и экономическое значение. Они служат основным источником биологически активных веществ. Один из резервов повышения производства плодов и ягод – использование для закладки плантаций оздоровленного высококачественного посадочного материала, выращенного с использованием современных биотехнологических методов [1]. Эти методы позволяют за относительно короткий промежуток времени получать большее количество растений генетически идентичных исходной форме, чем при использовании стандартных способов вегетативного размножения, а также свести потери материала к минимуму и обеспечить высокую рентабельность производства. Технология клонального микроразмножения позволяет

выращивать посадочный материал круглый год, тем самым обеспечивая непрерывность процесса производства [2].

Цель наших исследований заключалась в оптимизации приемов культивирования перспективных плодовых и ягодных культур в условиях *in vitro* для производственных условий.

**Условия, материалы и методы.** Исследования проводили в лаборатории биотехнологии растений Главного ботанического сада имени Н. В. Цицина Российской академии наук (ГБС РАН) в 2012–2018 гг.

В качестве исходного материала использовали представителей семейства Жимолостные (Caprifoliaceae Juss.) – сорта жимолости съедобной (*Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn) и жимолости голубой (*Lonicera caerulea* L.); семейства Розовые (Rosaceae Juss.) – сорта аронии (*Aronia Medik.*), вишни (*Cerasus Mill.*), малины и ежевики (*Rubus L.*), рябины (*Sorbus L.*); семейства Крыжовниковые (Grossulariaceae DC.) – сорта крыжовника (*Grossularia Hill.*) и смородины (*Ribes L.*); семейства Актинидиевые (Actinidiaceae Hutch.) – сорта актинидии коломикта (*Actinidia kolomikta* Pupr. ex Maxim.), актинидии острой (*Actinidia arguta* Siebold ex Zucc.) и актинидии полигамной (*Actinidia polygama* Siebold ex Zucc.); семейства Вересковые (Ericaceae Juss.) – сорта голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.).

Применяли общепринятые [3] и разработанные в лаборатории биотехнологии растений ГБС РАН [4] приемы работы с культурами изолированных тканей и органов растений. В качестве инициальных эксплантов использовали меристемы, изолированные из апикальных и латеральных почек, а также апексы активно растущих побегов. На этапе инициации использовали питательную среду MS (Murashige and Skoog, 1962) [5] с добавлением 6-BAP (6-Benzylaminopurine) в концентрации 0,3...0,5 мг/л. Этап пролиферации осуществляли на модифицированной среде MS и среде QL (Quorin and Lepoivre, 1977) [6] с добавлением сахарозы или глюкозы в концентрации 30 г/л и регуляторов роста 6-BAP в концентрации 0,2...2,0 мг/л и IAA (Indole-3-acetic acid) в концентрации 0,01...0,10 мг/л. Представители семейства Ericaceae, в отличие от остальных плодовых и ягодных культур, культивировали на питательной среде Андерсона (Anderson, 1984) [7] с добавлением гормонов IAA и 2 iP (N6-(2-Isopentenyl)adenine) в соотношении 1:5 и 4:15. На этапе укоренения использовали питательную среду ½ MS с добавлением IAA и IBA (Indole-3-butyric acid) в концентрации 0,5...1,5 мг/л.

Опыт проводили в трех повторностях, в каждой из которых отбирали не менее 30 эксплантов. Регенеранты культивировали при освещении 3000 лк и фотопериоде 16/8 ч, температуре 23...25 °C и влажности 70 %.

В процессе исследований измеряли длину побега, подсчитывали количество побегов и междоузлий, рассчитывали коэффициент размножения. Обработку данных осуществляли с помощью многофакторного дисперсионного анализа [8] с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010. Отклонение от средней на графиках показывает стандартное отклонение, НСР<sub>05</sub> – наименьшую существенную разность при 5 %-ном уровне значимости.

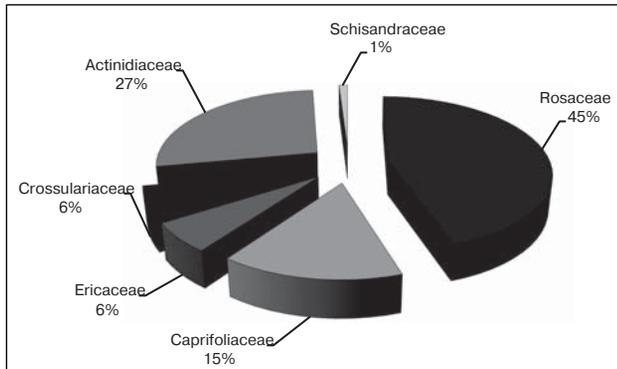


Рис. 1. Количественный состав плодовых и ягодных культур в генетическом банке *in vitro* ГБС РАН.

**Результаты и обсуждение.** На сегодняшний день генетический банк *in vitro* плодовых и ягодных культур ГБС РАН включает в себя более 300 видов, сортов и отборных форм ведущих селекционных центров, что составляет 1/4 от общей коллекции *in vitro* учреждения. Наиболее полно представлены семейства Rosaceae, Actinidiaceae и Caprifoliaceae (рис. 1).

При разработке и оптимизации технологий клонального микроразмножения для каждого таксона необходимо определить стратегию исследования: выбрать модель размножения и тип экспланта, подобрать условия, способствующие реализации его морфогенетического потенциала. Правильный выбор позволяет свести к минимуму риск появления соматоклональных вариантов.

Специфика клонального микроразмножения растений различных таксономических групп тесно связана с их биологическими особенностями. Изучение последних в природных условиях и в коллекциях ботанических садов послужило основой для разработки биотехнологических приемов культивирования с целью дальнейшего устойчивого воспроизводства [9].

При изучении представителей семейств Actinidiaceae, Caprifoliaceae, Rosaceae и др. прослеживается корреляция между динамикой роста при интродукции и темпами развития регенерантов в культуре *in vitro* [4]. Экспланты разных видов и сортов рода *Actinidia* существенно различались по способности к регенерации. Установлено, что экспланты *A. arguta* и *A. polygama* более активно развивались на всех стадиях культивирования *in vitro*, по сравнению с *A. kolomikta*, и это коррелировало с энергией роста названных видов в природных условиях [10].

Растения, относящиеся к разным таксонам, отличаются по уровню тотипотентности клеток и регенерационному потенциалу. Это обуславливает необходимость дифференцированного подхода к разработке методик клонального микроразмножения. Основным методом, используемый нами при размножении *in vitro* – активация развития существующих в растениях пазушных меристем, обеспечивает устойчивое воспроизводство и генетическую идентичность исходным формам.

Установлено, что главные факторы, определяющие процесс органогенеза, – генотип, эпигенетические характеристики клеток экспланта, физиологическое состояние интактных растений, состав питательной среды и условия культивирования [4]. Для большинства изученных таксонов наибольшее влияние на реализацию морфогенетического потенциала оказывают генетические особенности растений. Так, при проведении исследования на сортах *Actinidia kolomikta* было установлено, что наибольшее влияние на коэффициент размножения оказывали сортовые особенности (49%), по сравнению с концентрацией 6-BAР (24%) и

взаимодействием этих двух факторов (22%), наименьшее – случайные факторы (5%).

Генотип служит не только индикатором способности экспланта к микроразмножению, но и контролирует его потенциальную возможность к этому процессу. Таким образом, пределы изменчивости регенерационной способности эксплантов и количество формирующихся микрорастений *in vitro* определяются генотипически.

На этапе индукции развития меристем основной характеристикой регенерационных процессов было количество сформировавшихся микропобегов. Анализ морфогенетического потенциала мужской, обоеполой и женских форм *A. kolomikta* (рис. 2) показал, что наибольшая его величина характерна для женских форм. Особенно выделялся сорт Памяти Учителя (коэффициент размножения – 6,7), несколько меньший коэффициент размножения (5,2) отмечен у женских форм сортов Университетская и Прелестная.

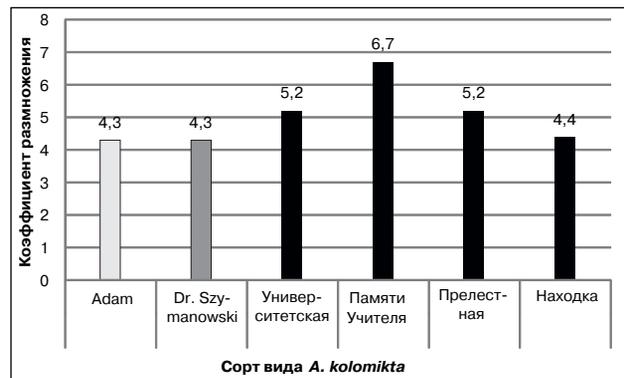


Рис. 2. Влияние сортовых особенностей на коэффициент размножения разных форм *A. kolomikta* (НСР<sub>05</sub>=0,4): □ – мужская форма; ■ – женская форма; ▒ – обоеполая форма.

Для большинства плодовых и ягодных культур на этапе собственно размножения была показана эффективность использования двух методов: индукции множественного побегообразования и микрочеренкования побегов с хорошо развитыми междоузлиями, что позволило значительно повысить коэффициент размножения.

Изучение морфогенетического потенциала позволило выделить таксоны, характеризующиеся более высокой способностью к регенерации побегов. Среди всех исследованных объектов наибольшей величиной этого показателя характеризовались представители родов *Aronia* и *Sorbus*: максимальный коэффициент размножения аронии (сорт Amit) составил 52,9, рябины (сорт Невежинская) – 42,7 [11].

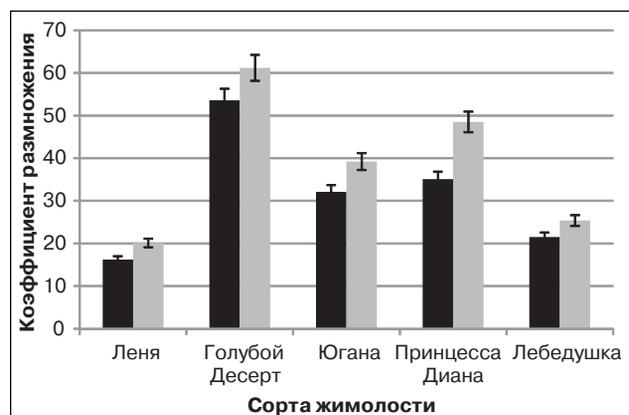
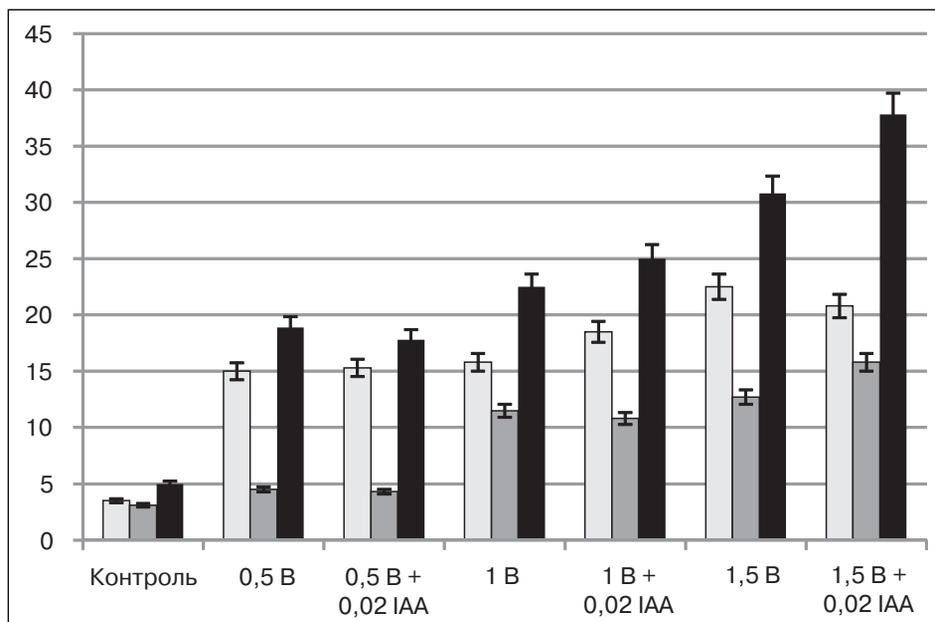


Рис. 3. Влияние минерального состава питательной среды на коэффициент размножения некоторых сортов жимолости: ■ – MS; ▒ – QL.



**Рис. 4.** Влияние регуляторов роста на коэффициент размножения некоторых сортов жимолости: □ – Лебедушка; ■ – Леня; ■ – Московская 23.

Один из важных факторов, который оказывает влияние на процессы морфогенеза органов и тканей растений *in vitro*, – состав питательной среды. В наших исследованиях для большинства изученных таксонов лучшие результаты были отмечены на питательной среде QL с пониженным содержанием азота. Ее успешно применяли для культивирования большинства плодовых и ягодных культур. Так, при использовании среды QL, по сравнению с MS, коэффициент размножения жимолости сорта Леня увеличился с 15,4 до 20,1, сорта Принцесса Диана – с 34,7 до 48,3 (рис. 3).

Для большинства сортов высокой голубики оптимальна среда Андерсона, дополненная 4 мг/л IAA и 15 мг/л 2 iP. Коэффициент размножения на ней увеличился в 2 раза, по сравнению со средой, дополненной 1 мг/л IAA и 5 мг/л 2 iP. Например, у сорта Блюрей он повысился с 2,0 до 5,8 [12].

При культивировании *in vitro* чаще всего в качестве источника углеводного питания используют сахарозу в концентрации 30 г/л. В наших исследованиях у большинства представителей семейств Actinidiaceae и Caprifoliaceae положительный эффект был отмечен при использовании глюкозы: коэффициент размножения увеличивался на 20...25 %.

Для получения и поддержания активно пролиферирующей культуры необходимо применять регуляторы роста. Правильный выбор фитогормона и его концентрации оказывает существенное влияние на развитие микрорастений. При сравнительном анализе результатов изучения влияния различных регуляторов роста установлено, что растения лучше развивались на питательной среде с совместным использованием цитокинина 6-BAР и ауксина IAA, что находит подтверждение в исследованиях других авторов [13, 14]. Так, у сорта жимолости Леня коэффициент размножения увеличился с 3,1 (на контрольной среде) до 15,9 (на среде с совместным применением 6-BAР и IAA), а у сорта Московская 23 с 4,9 до 37,8 (рис. 4).

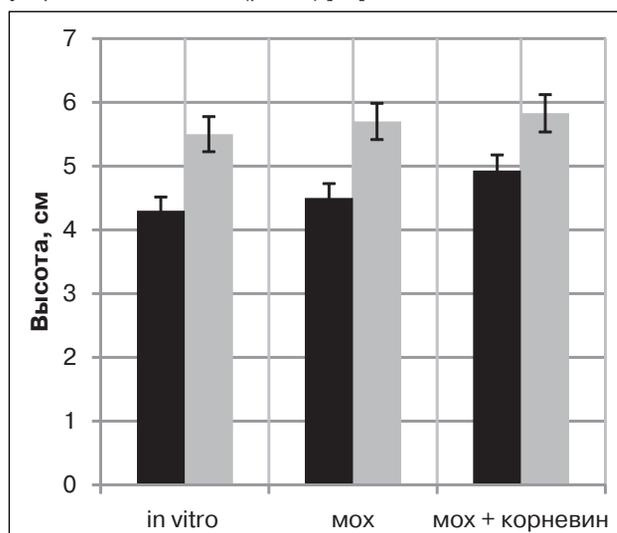
Необходимо отметить особые требования к культивированию представителей родов *Ribes* и *Cerasus*. Для успешного микроразмножения различных сортов крыжовников, красной смородины и вишни необходимо содержание культуры при пониженной температуре (15...18 °С), освещении 1500 лк и уменьшении в 1,5...2,0 раза содержания аммонийного и нитратного азота (особенно аммиачной формы) [11].

При длительном культивировании (более 1,5 месяцев) у микропобегов исследуемых сортов большинства плодовых и ягодных культур наблюдали спонтанный ризогенез. Для укоренения исследуемых таксонов наиболее эффективно использовать IAA и IBA в концентрациях 1,0...1,5 мг/л [11].

Адаптация растений-регенерантов к нестерильным условиям – завершающий, наиболее ответственный, дорогостоящий и трудоемкий этап клонального микроразмножения. В производственных условиях на этом этапе могут возникать большие потери (до 50 %). Укоренение и адаптация растений-регенерантов на мхе сфагнуме позволяет повысить выживаемость и

свести к минимуму потери растений при адаптации *ex vitro*, улучшить качество адаптированных растений, сократить сроки их получения и снизить себестоимость. При использовании мха сфагнума укореняемость и приживаемость регенерантов за счет благоприятных физико-химических и асептических свойств мха составляет около 100 %. Благодаря отсутствию патогенной микрофлоры нет необходимости в предварительном обеззараживании или пропаривании субстрата, что экономит затраты ручного труда, средств и предотвращает загрязнение окружающей среды [15].

Культивирование регенерантов на вегетирующем сфагновом мхе с предварительной обработкой побегов корневином (действующее вещество IBA) дало возможность обеспечить постепенное понижение относительной влажности воздуха, позволив тем самым провести адаптацию листового аппарата растений. Микрорастения отличались высокими темпами роста и развития, имели большую высоту (увеличение до 10 %), по сравнению с регенерантами, укореняемыми *in vitro* (рис. 5) [15].



**Рис. 5.** Высота микропобегов ежевики при различных условиях укоренения: ■ – ежевика «Агавам»; ■ – ежевика «Тонфри».

**Выводы.** В результате проведенных исследований были усовершенствованы приемы клонального микро-

размножения перспективных и малораспространенных сортов и отборных форм плодовых и ягодных культур с учетом их биологических особенностей на всех этапах культивирования для промышленного выращивания.

Доказана определяющая роль генетического фактора в реализации морфогенетического потенциала. Так, у сортов *Actinidia kolomikta* влияние сортовых особенностей на коэффициент размножения составило 49 %, концентрации 6-ВАР – 24 %, взаимодействия этих факторов – 22 %.

Сравнительное изучение морфогенетического потенциала мужской, обоеполой и женской форм *A. kolomikta* показало, что наибольшим морфогенетическим потенциалом характеризовались женские формы. Коэффициент размножения женской формы сорта Памяти Учителя составил 6,7, тогда как у мужской формы сорта Adam и обоеполой сорта Dr. Szymanowski он был равен 4,3.

У большинства сортов голубики в среде Андерсона с добавлением гормонов IAA и 2iP в соотношении 4:15 коэффициент размножения повышался в 2 раза, по сравнению со средой с соотношением 1:5.

#### Литература.

1. Ягодные культуры в Центральном регионе России / И. В. Казаков, С. Д. Айтджанов, С. Н. Евдокименко и др. М.: ФГБНУ ВСТИСП, 2016. 233 с.
2. Высоцкий В. А., Валиков В. А. Клональное микро размножение жимолости в производственных условиях // Садоводство и виноградарство. 2014. № 6. С. 12–13.
3. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
4. Молканова О. И., Васильева О. Г., Коновалова Л. Н. Научные основы сохранения и воспроизводства генофонда ценных и редких видов растений в культуре *in vitro* // Бюллетень ГБС РАН. 2015. Вып. 201. № 2. С. 78–82.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. No. 43. Pp. 473–497.
6. Quoirin M., Lepoivre P. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. // *Acta Hort.* 1977. Vol. 78. Pp. 437–442.
7. Anderson W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1984. Vol. 109. Pp. 343–347.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1980. 352 с.
9. Молканова О. И., Коновалова Л. Н., Стахеева Т. С. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* // Бюллетень ГНБС. 2016. № 120. С. 17–23.
10. Малаева Е. В. Биологические и молекулярно-генетические особенности дальневосточных видов рода *Actinidia* Lindl.: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2008. 20 с.
11. Молканова О. И., Егорова Д. А., Мелешук Е. А. Использование биотехнологических методов в сохранении и ускоренном размножении ягодных культур // Селекция и сортоведение садовых культур. 2018. Т. 5. № 1. С. 73–76.
12. Стахеева Т. С., Молканова О. И., Коновалова Л. Н. Особенности культивирования *in vitro* перспективных сортов высокой и полувисокой голубики // Современные проблемы гуманитарных и естественных наук: материалы XXX международной научно-практической конференции (Москва, 05-06 октября 2016 г.). М.: Научно-информационный издательский центр «Институт стратегических исследований», 2016. С. 24–28.
13. Муратова С. А., Соловых Н. В., Терехова В. И. Индукция морфогенеза из изолированных соматических тканей растений. Мичуринск: изд-во МичГАУ, 2011. 107 с.
14. Малаева Е. В., Молканова О. И., Коновалова Л. Н. Использование биотехнологических методов для ускоренного размножения ягодных культур // Плодоводство и ягодоводство России. 2016. Т. XXXV. С. 105–108.
15. Способ укоренения и адаптации растений, полученных в культуре *in vitro* с использованием мха сфагнума / О. И. Молканова, Л. Н. Коновалова, Е. И. Любимова и др. // Патент 2659237 РФ; опубл. 29.06.2018. Бюл. № 19. 2 с.

## IMPROVEMENT OF CLONAL MICROPROPAGATION TECHNOLOGY OF VALUABLE FRUIT AND BERRY CROPS VARIETIES FOR COMMERCIAL CONDITIONS

O. I. Molkanova, O. V. Koroleva, T. S. Stacheeva, I. L. Krakhmaleva, E. A. Meleshchuk

N. V. Tsytsyn Main Botanic Garden of the RAS, ul. Botanicheskaya, 4, Moskva, 127276, Russian Federation

**Abstract.** The authors optimized *in vitro* cultivation methods of promising fruit and berry crops for their using under the commercial cultivation conditions. The investigations were carried out on promising fruit and berry varieties of genera *Lonicera*, *Aronia*, *Cerasus*, *Rubus*, *Sorbus*, *Grossularia*, *Actinidia*, *Vaccinium* in 2012–2018. Sections of meristem of apical and lateral buds and shoot apices were used as initial explants. Murashige and Skoog medium (MS) with 6-BAP (0.3–0.5 mg/L) was used at the stage of initiation. At the proliferation stage, we used modified MS and Quirin and Lepoivre (QL) media with the addition of sucrose or glucose (30 g/L), 6-BAP (0.2–2.0 mg/L) and IAA (0.01–0.10 mg/L). Shoots of Ericaceae family were cultivated on Anderson medium with the addition of IAA and 2iP in the ratio of 1:5 and 4:15. At the rooting stage, we used 1/2 MS with IAA and IBA (0.5–1.5 mg/L). The replication was three-fold, no less than 30 explants were examined in each replication. Genetic characteristics exert the determining influence on the realization of plant morphogenetic potential in comparison with the influence of growth regulators (for example, in *Actinidia kolomikta* the values were 49% and 24% respectively). Most explants developed better on the mineral basis of the QL medium than on MS one. Thus, the growth coefficient of honeysuckle 'Princess Diana' increased from 35.7 to 48.5. Most objects showed the increase in the proliferation coefficient when glucose was used as the source of carbohydrate nutrition and cytokinins and auxins were used simultaneously as growth regulators. In this case, the propagation coefficient of genus *Lonicera* increased from 3.1 to 37.8. The optimal substrate for plant adaptation to *ex situ* conditions was *Sphagnum*. Microplants were characterized by high rates of growth and development, had a higher altitude (up to 10%), compared with regenerants, implanted *in vitro*.

**Keywords:** clonal micropropagation; fruit and berry crops; nutrient media; *in vitro* gene bank.

**Author Details:** O. I. Molkanova, Cand. Sc. (Agr.), leading research fellow (e-mail: molkanova@mail.ru); O. V. Koroleva, junior research fellow; T. S. Stacheeva, junior research fellow; I. L. Krakhmaleva, junior research fellow; E. A. Meleshchuk, engineer.

**For citation:** Molkanova O. I., Koroleva O. V., Stacheeva T. S., Krakhmaleva I. L., Meleshchuk E. A. Improvement of Clonal Micropropagation Technology of Valuable Fruit and Berry Crops Varieties for Commercial Conditions. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2018. Vol. 32. No. 9. Pp. 66–69 (in Russ.). DOI: 10.24411/0235-2451-2018-10915.