И. В. Князева, СИС, к. б. н.
ФГБНУ ВСТИСП, Россия, г. Москва
knyazewa.inna@yandex.ru

УДК 634.75:581.14

DOI 10.31676/2073-4948-2019-58-240-245

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МИКРОРАСТЕНИЙ ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ДЕПОНИРОВАНИИ

Реферат. При изучении влияния температурного режима на жизнеспособность эксплантов ягодных культур определены оптимальные сроки и условия культивирования. Депонирование эксплантов земляники садовой сорта 'Наше Подмосковье', малины обыкновенной 'Брянское Диво' и смородины черной 'Брянский Агат' в условиях положительных пониженных температур (+4-6 °C) позволило сохранить жизнеспособность микрорастений на протяжении 12 месяцев беспересадочного культивирования. Сохранение коллекции ягодных культур *in vitro* при температуре +4-6 °C способствовало продлению жизнеспособности микрорастений у земляники садовой на 16,2 %, у смородины черной — на 10,0 % и малины обыкновенной на 3,0 % по сравнению с содержанием ее при температуре 22-24 °C.

Ключевые слова: земляника, малина, смородина черная, сорт, культивирование *in vitro*, температура

Summary. When studying the influence of temperature on the viability of explants of small fruit crops, the optimal terms and conditions of cultivation were determined. Depositing of explants of *Fragaria x ananassa* Duch. of variety 'Nashe Podmoskov'e', *Rubus idaeus* L., variety 'Bryanskoe Divo' and *Ribes nigrum* L. variety 'Bryanskij Agat' at the temperature of +4-6 °C allowed to keep the viability of microplants for 12 months of through-cultivation. Preserving the *in vitro* collection of small fruit crops at the temperature of +4-6 °C prolonged the viability of microplants of strawberries by 16.2 %, black currants by 10.0% and raspberries by 3.0 % compared to its maintenance at the temperature of 22-24 °C.

Keywords: strawberry, raspberry, blackcurrant, variety, *in vitro* culture, temperature

Введение

Совершенствование биотехнологических методов и приемов позволяет сохранять растительные объекты длительное время, в том числе — генетические коллекции в условиях *in vitro*.

Базовые коллекции сохраняют в условиях, обеспечивающих их длительное хранение (long-term conservation), доступ к ним предельно ограничен. Активные коллекции служат для восстановления, размножения, рассылки и изучения образцов и сохраняются в условиях, обеспечивающих среднесрочное хранение (medium-term conservation). Дублетные коллекции хранят отдельно от базовой коллекции с целью увеличения надежности хранения [1].

При работе с растительными объектами необходимо стабильно поддерживать условия культивирования (температуру, влажность, освещенность) при определенном составе питательной среды. Соблюдение этих требований способствует длительному сохранению генетических коллекций [2].

Поддержание и хранение растений методом культуры тканей осуществляется в условиях нормальной скорости роста, минимального роста (депонирование) и криоконсервирования [3].

Виды растений различаются по своим потребностям в отношении температуры, освещенности и фотопериода. В качестве фактора, замедляющего рост растений, может выступать пониженная температура в интервале от -1 до $+10$ °C и добавление в питательные среды органических веществ, обладающих высокой осмотической активностью: сахарозы, глюкозы, маннита или сорбита [4-6].

Использование в течение длительного хранения низких температур ($+4$ °C), обеспечивающих минимальный рост культивируемых микрорастений, было успешно испытано на землянике и малине [7]. Наиболее высокой выживаемостью после 20 месяцев хранения *in vitro* при $+4$ °C обладают микрорастения земляники, наиболее низкой — малины [8].

По данным, приведенным в работе И. В. Митрофановой (2018), температура хранения от $+4$ до $+6$ °C предпочтительнее, чем $+12$ и $+14$ °C. Депонирование эксплантов данных культур при температуре $+4$ °C и $+6$ °C, способствовало их сохранению в жизнеспособном состоянии (95 %) в течение 6 месяцев [9].

Увеличение длительности беспересадочного хранения пробирочных растений достигается при повышении их устойчивости к холоду. Для этого проводят закалку микрорастений, воздействуя на них каждые сутки попеременно положительной и отрицательной температурами ($+22$ °C, 8 часов на свету / -1 °C, 16 часов в темноте) на протяжении одной недели. Такая процедура дает хорошие результаты при последующем хранении *in vitro* коллекций *Ribes* L., *Fragaria* L., *Rubus* L. [10].

Цель настоящей работы заключается в усовершенствовании метода сохранения и поддержания генетической коллекции ягодных культур в контролируемых условиях среды *in vitro*.

Материалы и методы исследований

В работе использовали микрорастения из генетической коллекции *in vitro* ягодных культур отдела биотехнологии и защиты растений в 2018-2019 гг.: земляники садовой *Fragaria x ananassa* Duch. (сорт Наше Подмосковье), малины обыкновенной *Rubus idaeus* L. (сорт Брянское Диво) и смородины черной *Ribes nigrum* L. (сорт Брянский Агат). Растительный материал размножали по стандартной технологии на среде Мурасиге-Скуга (МС) с целью получения нужного для эксперимента количества отдельных эксплантов (микропобегов) [11].

На этапе пролиферации (шестое субкультивирование) из размноженного растительного материала отбирали по 20 микрочеренков каждого сорта для длительного беспересадочного культивирования в разных температурных режимах. Культивирование осуществляли в климатической камере КС-200 (Россия) при нормальной скорости роста (+22-24 °С, 16-часовом световом дне и освещенности 3000-5000 люкс) и в холодильной камере марки Liebherr (Германия) в условиях положительных пониженных температур (+4...6 °С), при интенсивности освещения 500-1000 люкс и режиме короткого дня 8/16 ч.

В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки 1,5 × 16 см, предварительно стерилизованные сухим жаром (+150...200 °С) с 10 мл агаризованной среды.

Для сохранения жизнеспособности депонируемых эксплантов проводили двухнедельное культивирование микрочеренков ягодных культур при температуре +22...24 °С, затем микрочеренки переносили на среднесрочное хранение в холодильную камеру при температуре +4...6 °С. Во всех вариантах микрочеренки культивировали на гормональной среде МС, дополненную 0,7 мг/л 6-бензиламинопкрин (БАП), 0,1 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК), 30 г/л сахарозы и 8 г/л агар-агара (Panreac, Spain).

Способность эксплантов к органогенезу в условиях *in vitro* оценивали визуально по четырехступенчатой бонитировочной шкале, специально разработанной во ФГБНУ ВСТИСП [12]. Учёт состояния образцов (количество живых и погибших растений, %) проводили один раз в 3 месяца.

Обсуждение результатов

На рисунке 1 представлены результаты беспересадочного культивирования малины, земляники и смородины черной при нормальной скорости роста.

Рис. 1. Жизнеспособность микрорастений ягодных культур на протяжении 360 суток при температуре +22-24 °С.

При изучении влияния температурного режима $+22...24^{\circ}\text{C}$ на сохранение микрорастений изучаемых культур в течение 3 месяцев (90 суток) количество жизнеспособных эксплантов составило 64,4-94,4 %. Сохранение в течение 6 месяцев (180 суток) в условиях постоянно растущей культуры *in vitro* эксплантов показало, что микрочеренки оставались зелеными и жизнеспособными на уровне 33,8-57,5 %. При данных температурах к 9 месяцу (270 суток) беспересадочного культивирования наблюдается снижение количества живых эксплантов в 1,5-2 раза. Регенерационная способность микрорастений земляники, малины и смородины черной изучаемых сортов на протяжении 12 месяцев (360 суток) варьировала в пределах от 5,0 до 17,5 %. Наиболее низкой жизнеспособностью обладали экспланты малины и земляники по сравнению с микрорастениями смородины черной. Проявлялись признаки угнетения развития: массовое усыхание листьев, некротические образования, изменение цвета листьев на желто-коричневый, а также интенсивное выделение фенолов, что приводило к снижению жизнеспособности до 5,0 %.

На протяжении 3 месяцев (90 суток) депонирования при температуре $4...6^{\circ}\text{C}$ жизнеспособность эксплантов ягодных культур сортов Брянский Агат, Наше Подмосковье и Брянское Диво оставалась высокой и составила 66,3-80,6 % (рис. 2).

■ земляника садовая ▨ малина обыкновенная ■ смородина черная

Рис. 2. Жизнеспособность микрорастений ягодных культур на протяжении 360 суток при температуре $4-6^{\circ}\text{C}$.

В процессе депонирования увеличение сроков до 9 месяцев (270 суток) сохраняло жизнеспособность микрорастений земляники и смородины черной на уровне 40 %, малины — 17,5 %.

После 12 месяцев сохранения в условиях положительных пониженных температур жизнеспособность эксплантов земляники садовой и смородины черной составила 25,6-27,5 %. Регенеранты оставались зелеными, жизнеспособными, лишь у отдельных растений наблюдали первые признаки угнетения развития (усыхание отдельных листьев). При депонировании малины в течение 12 месяцев доля живых растений составила 8,1 %.

Наблюдения показали, что депонирование при температуре +4...6 °С значительно увеличивало как период субкультивирования, так и жизнеспособность эксплантов у земляники садовой на 16,2 %, у смородины черной — на 10,0 % и малины обыкновенной — на 3,0 % по сравнению с содержанием их при нормальной скорости роста +22...24 °С.

Выводы

При изучении влияния температурного режима на сохранение эксплантов ягодных культур определены оптимальные сроки и условия культивирования: при температуре +22...24 °С для земляники и малины — не более 6 месяцев беспересадочного хранения; для смородины черной — до 9 месяцев; при температуре +4...6 °С для земляники и смородины черной — 9-12 месяцев; малины — не более 6 месяцев среднесрочного хранения.

Сохранение коллекции ягодных культур *in vitro* при температуре +4...6 °С способствовало продлению жизнеспособности микрорастений у земляники садовой — на 16,2, у смородины черной — на 10,0 и малины — обыкновенной на 3,0 % по сравнению с содержанием ее при температуре +22...24 °С.

По результатам исследований установлено, что после 12 месяцев среднесрочного хранения при пониженной положительной температуре жизнеспособность микрорастений земляники и смородины черной остается на уровне 25,6-27,5 %, при этом оставшиеся микрорастения имеют лишь отдельные желтые листья. Количество жизнеспособных эксплантов малины сорта Брянское Диво после 12 месяцев депонирования не превышало 8,1 %.

Список использованной литературы

1. ФАО. Стандарты генных банков для генетических ресурсов растений для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства. Издание второе, исправленное и дополненное. // Рим, 2015. — 162 с.
2. Kulus D., Zalewska M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species — A review // Sci. Hort., 2014, Vol. 168. — P. 88-107.
3. Engelmann F. *In vitro* conservation methods // Biotechnology and plant genetic resources: Conservation and use / Eds. Ford-Lloyd B.V., Newbury J.H., Carrow J.A., — UK: Wallingford: CABI Publishing, Vol. 3. — № 1. — 1997. — P. 119-162.
4. Князева И. В. Особенности длительного хранения ягодных культур *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2018. — Т. 55. — С. 69-70.

5. **Brailko V., Ivanova N., Mitrofanova I.** Characteristics of the Assimilation in the Clematis Plants Propagated In Vitro // In Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant. — 2018 — Vol. 58, Suppl. 1 — P. 45 <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9929-7>.
6. **Ozudogru E.A., Previati A., Lambardi M.** *In vitro* Conservation and Cryopreservation of Ornamental Plants // Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols) / Eds. Jain S.M., Ochatt S. — Vol. 589. — New York: Dordrecht: Heidelberg: London: Springer: Humana Press, 2010 — P. 303-324 <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-128>
7. **Lisek A., Orlikowska T.** *In vitro* Storage of Strawberry and Raspberry in Calcium-Alginate Beads at 4°C // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 2004. — V. 78. — Issue. — pp 167–172.
8. **Саматова И. С.** Динамика морфофизиологических показателей ежевики, малины и земляники при длительном хранении *in vitro*: автореф. дисс. ... к. б. наук. СПб. 2009. — 26 с.
9. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур: Коллективная монография / под. общей редакцией И. В. Митрофановой. — Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. — 260 с.
10. **Reed B. M.** *In vitro* Culture and Cryogenic Preservation. An Operation Manual for the National Clonal Germplasm Repository. Corvallis. Or. — 1999. — P. 46.
11. **Алексеев Л. В., Высоцкий В. А.** Методика регенерации плодовых и ягодных растений в культуре эксплантов различного происхождения. М., 2008. — 25 с.
12. **Высоцкий В. А.** Совершенствование методов сохранения ценных генотипов плодовых и ягодных культур *in vitro*. // Плодоводство и ягодоводство России. — 2015. — Т. XXXXI. — С.69-73.

I. V. Knyazeva,

All-Russian Horticultural Institute for Breeding, Agrotechnology and Nursery,
Russia, Moscow

VIABILITY OF SMALL FRUIT CROPS MICROPLANTS DURING LONG DEPOSITING