

И. Л. Крахмалева, мнс,
О. И. Молканова, внс, канд. с.-х. наук
ФГБУН «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина» РАН,
Россия, г. Москва
seglory@bk.ru

УДК 634.725:57.082.542

DOI 10.31676/2073-4948-2020-62-105-114

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ КРЫЖОВНИКА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Реферат. В статье представлены результаты исследования особенностей морфогенеза сортов крыжовника обыкновенного (*Ribes uva-crispa* L.) на всех этапах культивирования *in vitro* и адаптации к условиям *ex vitro*. На этапе введения в культуру *in vitro* установлен оптимальный способ стерилизации: последовательное применение 2 % раствора «Фундазола» с экспозицией 10-15 минут, 70 % этанола в течение 30 секунд и 7 % гипохлорита кальция – 5-7 минут. Максимальное количество жизнеспособных регенерантов крыжовника было получено при отборе первичных эксплантов в период начала активного роста побегов (апрель – начало мая). Частота регенерации при этом составила 70-80 % в зависимости от сорта. Определен оптимальный размер эксплантов, минеральный и углеводный состав питательных сред и условия культивирования на этапе собственно микроразмножения. Наибольшим значением коэффициента размножения характеризовались сорта: Грушенька (6,1-6,7), Берилл (3,1-4,9) и Черномор (3,5-4,5). Установлено, что для культивирования исследуемых сортов крыжовника наиболее эффективно использовать питательную среду с минеральной основой Quorin and Leroivre. В качестве источника углеводов оптимальным было использование сахарозы в концентрации 30 г/л. Установлено, что на этапе собственно микроразмножения наиболее эффективно культивировать крыжовник в течение 20-25 дней при пониженной температуре 16-18 °С. На этапе ризогенеза выявлена эффективность использования ИМК в концентрации 1,0 мг/л. Применение мха сфагнума в составе почвенного субстрата при адаптации регенерантов крыжовника способствовало высокой приживаемости от 97 % до 100 % на всех вариантах субстрата. Изучение влияния состава почвенного субстрата на динамику роста регенерантов показало, что адаптацию крыжовника было эффективно осуществлять на субстрате, состоящем из торфа и мха сфагнума.

Ключевые слова: *Ribes uva-crispa* L., клональное микроразмножение, регенерация микропобегов, коэффициент размножения, ризогенез, адаптация

Summary. The article presents the results of the study on the morphogenesis peculiarities of *Ribes uva-crispa* L. varieties at all stages of *in vitro* cultivation and adaptation to *ex vitro* conditions. The optimal method of sterilization at the initiation stage to *in vitro* culture was established:

consistent application of 2 % «Fundazole» solution with an exposure of 10-15 minutes, 70 % ethanol for 30 seconds and 7 % calcium hypochlorite for 5-7 minutes. The maximum number of viable gooseberry regenerants was obtained in the selection of initial explants during the beginning of active shoots growth (April – early May). The regeneration frequency was 70-80 %, depending on the variety. The optimal size of explants, the mineral and carbohydrate composition of the culture medium, and the cultivation conditions at the propagation stage were determined. The highest multiplication rate was characterized by varieties: Grushenka (6.1-6.7), Beryl (3.1-4.9) and Chernomor (3.5-4.5). It has been established that Quorin and Lepoivre culture medium was the most effective medium for the cultivation of the studied gooseberry varieties. As a source of carbohydrates, the use of sucrose at a concentration of 30 g/L was optimal. It was found effective to cultivate gooseberries for 20-25 days at a reduced temperature (16-18 °C) at the propagation stage. The efficiency of using 1.0 mg/l IBA at the rooting stage was revealed. The use of sphagnum as part of the soil substrate at the adaptation of gooseberry regenerants contributed to a high survival rate (97-100 %) in all substrate variants. The study of the influence of the composition of the soil substrate on the growth dynamics of regenerants showed that the adaptation of gooseberries was effectively carried out on a substrate consisting of peat and sphagnum.

Keywords: *Ribes uva-crispa* L., clonal micropropagation, microshoot regeneration, multiplication rate, rhizogenesis, adaptation

Работа выполнена в рамках ГЗ ГБС РАН (№18-118021490111-5).

Введение

Крыжовник обыкновенный (*Ribes uva-crispa* L., семейство Grossulariaceae DC. – Крыжовниковые) является ценной ягодной культурой. В результате селекционных работ получено более 1500 сортов крыжовника разного срока созревания. Плоды его разнообразны по окраске, размеру, вкусу и аромату. В ягодах содержится 13,5 мг% сахаров (преимущественно моносахаридов), 37-54 мг% аскорбиновой кислоты, веществ Р-активности, витаминов В и А, макро- и микроэлементов (калий, кальций, магний, фосфор, медь, железо). Ягоды крыжовника употребляются в свежем виде и используются в различной степени зрелости для приготовления варенья, повидла, соков, компотов и мармелада. Плоды обладают мочегонными и кровоостанавливающими свойствами, что находит широкое применение в народной медицине [1, 2].

Крыжовник является культурой, трудно размножаемой традиционными способами, что связано с низкой укореняемостью черенков и малым выходом качественного посадочного материала. Поэтому в последнее время для размножения крыжовника все чаще используют современные биотехнологические методы, которые позволяют в короткие сроки получить выровненный и оздоровленный посадочный материал идентичный исходному сорту [3, 4].

В 1968 г. О.Р. Jones и S.J. Vine впервые показали возможность получения регенерантов крыжовника из изолированных меристематических верхушек [5].

Несмотря на многочисленные исследования по изучению особенностей культивирования крыжовника *in vitro* некоторые этапы клонального микроразмножения остаются не завершенными [3, 4, 6]. Одной из причин является высокая гетерогенность сортов, влияющая на образование, развитие микропобегов и специфичные требования к условиям культивирования. При культивировании эксплантов крыжовника для большинства генотипов свойственно образование конгломератов мелких микропобегов, которые трудно использовать для укоренения [6, 7]. Многие исследователи отмечают низкую приживаемость регенерантов при адаптации к условиям *ex situ* [8, 9].

Цель данной работы – оптимизация условий, приемов культивирования в условиях *in vitro* и способов адаптации перспективных сортов крыжовника.

Объекты и методы исследований

Исследования проводили в лаборатории биотехнологий растений ФГБУН ГBS им. Н. В. Цицина РАН. В качестве объектов использовали отечественные сорта крыжовника селекции ФГБНУ ВСТИСП: Грушенька, Колобок, Розовый-2; ФГБНУ ЮУНИИСК: Берилл; ФГБНУ ВНИИС им. И. В. Мичурина: Черносливовый, Черномор, а также Западноевропейский сорт Финик.

Методика биотехнологических исследований с культурами изолированных тканей и органов растений основывалась на общепринятых классических приемах и усовершенствованных в лаборатории биотехнологии растений ГBS РАН [10, 11].

В качестве первичных эксплантов использовали меристемы, изолированные из апикальных и латеральных почек, а также апексы активно растущих побегов. Для поверхностной стерилизации последовательно применяли 2 % раствор фунгицида «Фундазола», 70 % раствор этанола (C_2H_6O) и 7 % раствор гипохлорита кальция ($Ca(ClO)_2$).

На этапе собственно микроразмножения использовали среды MS (Murashige and Skoog, 1962) [12] и QL (Quorin and Lepoivre, 1977) [13] с добавлением разных источников углеводов (сахароза или глюкоза 30 г/л) и регуляторов роста 6-БАП (6-бензиламинопурин) в концентрации 0,3-0,8 мг/л и ИУК (3-индолилуксусная кислота) в концентрации 0,01 мг/л.

На этапе укоренения использовали питательную среду $1/2$ MS с добавлением ИУК и ИМК (индолил-3-масляная кислота) в концентрации 1,0 мг/л. В качестве контроля использовали питательную среду $1/2$ MS без добавления гормонов.

Через 20 – 25 дней культивирования учитывали морфометрические показатели развития регенерантов. Исследования были проведены в трех повторностях, по 30 эксплантов в каждой. Регенеранты культивировали при освещении 1500-2000 Лк, температуре 15-20 °С, с фотопериодом 16/8 часов.

Адаптацию регенерантов осуществляли на почвенном субстрате, состоящем из торфа (рН 5,5 – 6,5) и мха сфагнума с добавлением: песка, перлита или вермикулита в соотношении 2:1. В качестве контроля использовали торф.

Исследования проводили в трех повторностях, 10 растений в каждом варианте. Через 3 и 5 недель подсчитывали приживаемость и измеряли высоту регенерантов.

Обработку полученных данных проводили по общепринятым методам статистического анализа с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 и PAST 2.17с.

Результаты и обсуждение исследований

При получении стерильной культуры основную роль играют размер эксплантов, правильный выбор способов стерилизации и срока отбора. В качестве первичных эксплантов крыжовника были использованы изолированные меристемы размером 0,2-0,4 мм, вычлененные из верхушечных почек побегов, или фрагменты стебля. На этапе введения в культуру *in vitro* оптимальной была последовательная стерилизация эксплантов, состоящая из обработки 2 % раствором «Фундазола» в течение 10-15 минут, 70 % раствором этанола – 30 секунд, 7 % раствором гипохлорита кальция – 5-7 минут в зависимости от физиологического состояния эксплантов.

Оптимальным сроком отбора первичных эксплантов для получения стерильной культуры крыжовника было начало активного роста побегов (апрель – начало мая). Первичные экспланты культивировали на питательной среде MS с 0,3 мг/л 6-БАП (рис. 1). Экспланты начинали развиваться на 8-10 сутки культивирования. Частота регенерации при этом составила 70-80 % в зависимости от сорта. На питательной среде без регуляторов роста экспланты развивались слабо и погибали на 10-14 сутки. Активное образование адвентивных почек и микропобегов у всех сортов крыжовника наблюдали после 3-4-го субкультивирования.

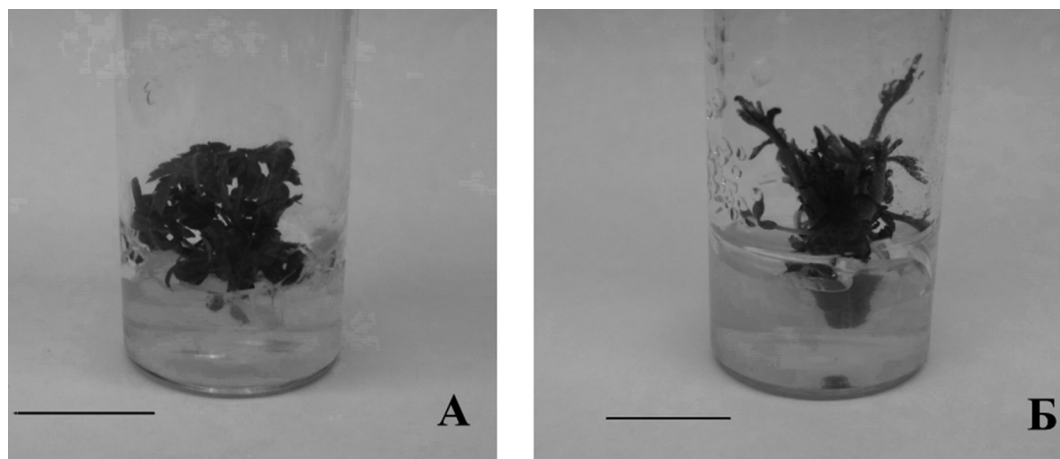


Рис. 1. Развитие эксплантов крыжовника: А – Финик, Б – Колобок (отрезок для масштабирования соответствует 1 см)

Одним из важных факторов, оказывающих влияние на процессы морфогенеза органов и тканей растений *in vitro*, является состав питательной среды. Матушкина О. В. и некоторые исследователи рекомендуют на этапе собственно микроразмножения крыжовника использовать питательную среду QL, на которой коэффициент размножения увеличивался в 1,4 раза по сравнению со средой MS [14]. В наших исследованиях по изучению влияния минерального состава питательной среды на регенерацию микропобегов крыжовника наблюдали подобные результаты – на среде QL с 0,8 мг/л 6-БАП и 0,01 мг/л ИУК коэффициент размножения увеличивался в 1,3-1,8 раз по сравнению с MS (рис. 2)

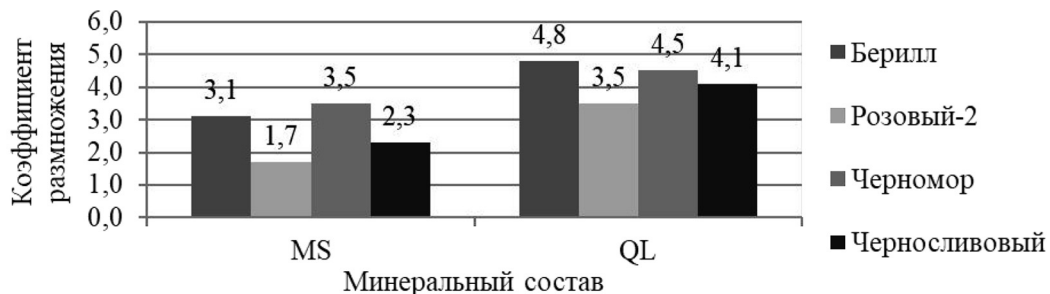


Рис. 2. Влияние минерального состава питательной среды на коэффициент размножения сортов крыжовника на этапе собственно микроразмножения ($HCP_{05} 0,9$)

При культивировании регенерантов в культуре *in vitro* чаще всего в качестве источника углерода в составе питательной среды используют сахарозу в концентрации 20-40 г/л. Наряду с этим многие авторы отмечают положительное влияние замены сахарозы на глюкозу при культивировании плодовых и декоративных культур [15, 16].

При замене углеводного состава в питательной среде MS (сахарозу на глюкозу) с добавлением 0,3 мг/л 6-БАП не наблюдали существенных различий в коэффициенте размножения сортов крыжовника на этапе собственно микроразмножения (табл. 1). Подобные результаты были получены и другими исследователями [17].

Таблица 1.

Влияние типа углеводного питания на регенерацию сортов крыжовника на этапе собственно микроразмножения

Сорт	Тип углеводного питания	Коэффициент размножения	Число микропобегов, шт.	Высота микропобегов, см
Берилл	сахароза	4,38±0,53	3,19±0,47	0,76±0,11
	глюкоза	4,88±0,55	4,24±0,53	0,55±0,07
Грушенька	сахароза	6,72±0,58	4,83±0,42	0,60±0,03
	глюкоза	6,10±0,49	4,86±0,32	0,54±0,03

Необходимо отметить, что при культивировании на питательной среде, содержащей сахарозу, наблюдали увеличение высоты микропобегов у сорта Берилл на 38 %, а у Грушенька на 11 %, что положительно влияло на дальнейшее укоренение.

Многие авторы отмечают существенное влияние сортовых особенностей при клональном микроразмножении крыжовника и значительную вариабельность коэффициента размножения [3, 18]. Среди исследованных сортов крыжовника наибольшим значением коэффициента размножения характеризовались сорта Грушенька (6,1-6,7), Берилл (3,1-4,9) и Черномор (3,5-4,5).

Для успешной регенерации крыжовника на этапе собственно микроразмножения необходимо отметить особые требования к условиям культивирования. Культура крыжовника отличается коротким сроком субкультивирования – длительность пассажа не должна превышать 1 месяц. Ранее в наших исследованиях показано существенное влияние пониженной температуры при культивировании на развитие изолированных апексов у большинства сортов. Низкая температура (16-18 °С) при культивировании крыжовника снижала токсическое действие веществ фенольной природы, что положительно влияло на его регенерационную способность [15]. Выявлено, что наиболее жизнеспособными эксплантами крыжовника являлись конгломераты из 3-4 микропобегов.

На этапе собственно микроразмножения при длительном культивировании (60 суток) на питательной среде MS с 0,2 мг/л 6-БАП у большинства сортов крыжовника наблюдали спонтанное укоренение микропобегов.

Для сортов крыжовника на этапе укоренения наиболее эффективным оказался ауксин ИМК в концентрации 1,0 мг/л, который способствовал лучшему формированию корневой системы по сравнению с 1,0 мг/л ИУК (рис. 3).

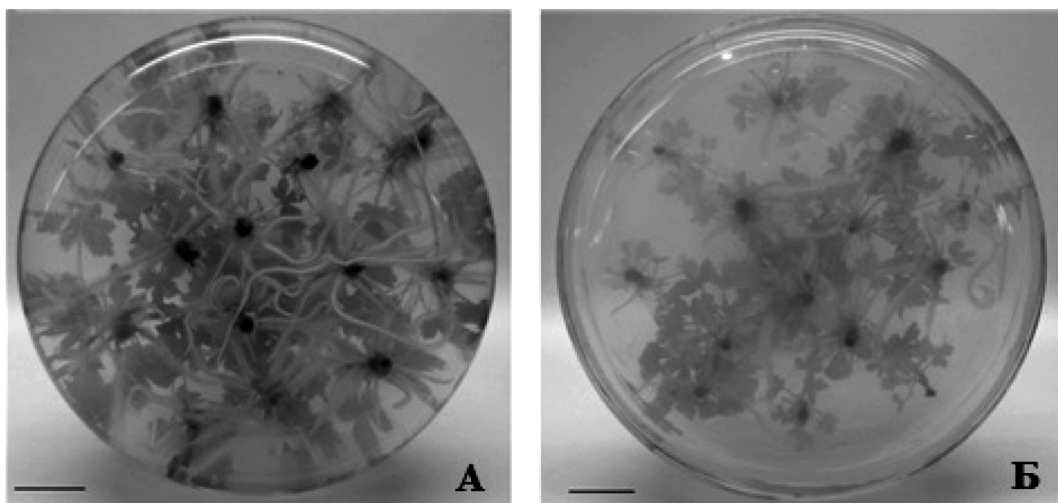


Рис. 3. Ризогенез *in vitro* микропобегов крыжовника сорта Берилл на питательных средах с различными регуляторами роста: А – 1,0 мг/л ИМК, Б – 1,0 мг/л ИУК (отрезок для масштабирования соответствует 1 см)

Для успешного укоренения сортов крыжовника также большое значение имел размер микропобегов (0,8-1,0 см). Исследуемые сорта крыжовника на этапе собственно микроразмножения образовывали микропобеги небольшой высоты, поэтому возникала необходимость в дополнительном этапе элонгации – культивирование на питательной среде с пониженным содержанием гормонов, при более низкой температуре (18-20 °С) и освещенности (1 000 Лк), что способствовало увеличению высоты микропобегов в среднем в 2,5 раза [15].

Адаптация микрорастений является заключительным этапом клонального микроразмножения и одним из наиболее дорогостоящих и трудоемких. Для успешной адаптации регенерантов к условиям *ex vitro* многие авторы отмечают значительное влияние состава почвенного субстрата [9, 19].

Длительность адаптации крыжовника к условиям *ex vitro* в среднем составила 20-25 суток. В наших исследованиях адаптацию регенерантов проводили с добавлением мха сфагнума, который позволил повысить приживаемость и свести к минимуму потери растений. На всех вариантах используемого в исследовании почвенного субстрата приживаемость составила от 97 % до 100 %.

В процессе исследования были выявлены различия в динамике роста сортов крыжовника при применении почвенного субстрата с разным составом (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние типа почвенного субстрата на развитие регенерантов крыжовника на этапе адаптации

Сорт	Тип почвенного субстрата	Высота регенерантов, см	
		21 сутки	35 суток
Берилл	Торф (контроль)	2,5±0,2	6,1±0,3
	Торф и песок (2:1)	2,4±0,2	6,3±0,3
	Торф и перлит (2:1)	2,0±0,2	5,1±0,5
	Торф и вермикулит (2:1)	2,0±0,2	5,5±0,4
Грушенька	Торф (контроль)	3,1±0,2	6,1±0,2
	Торф и песок (2:1)	3,0±0,2	5,5±0,3
	Торф и перлит (2:1)	3,1±0,1	6,1±0,2
	Торф и вермикулит (2:1)	2,8±0,1	5,3±0,2

На 21 и 35 сутки на этапе адаптации у крыжовника сорта Берилл наибольшую динамику роста наблюдали на субстрате из торфа (2,5 ±0,2 и 6,1 ±0,3) и состоящем из торфа с добавлением песка (2,4 ±0,2 и 6,3 ±0,3). У сорта Грушенька на 21 и 35 сутки наибольшие значения отмечали на двух вариантах субстрата: торф (3,1 ±0,2 и 6,1 ±0,2) (рис. 4) и торф с перлитом (3,1 ±0,1 и 6,1 ±0,2).



Рис. 4. Стадия адаптации крыжовника сорта Грушенька (субстрат из торфа, 35 суток)

Наименьшую динамику роста у исследуемых сортов наблюдали на почвенном субстрате, состоящем из торфа с добавлением вермикулита. Как показали полученные нами данные по высоте регенерантов на 21 и 35 сутки на этапе адаптации, применение почвенного субстрата, состоящего из торфа, эффективно влияет на темп роста крыжовника.

Через 3-4 месяца после адаптации *ex vitro* растения высаживали на коллекционно-производственный участок. Все растения имели 1-3 побега и хорошо развитую корневую систему.

Заключение

В процессе исследования были оптимизированы условия и приемы культивирования перспективных сортов крыжовника на всех этапах клонального микроразмножения. Оптимальными сроками отбора первичных эксплантов был период начала активного роста побегов (апрель – начало мая). На этапе введения в культуру *in vitro* наиболее эффективным был способ стерилизации, состоящий из последовательного применения 2 % раствора «Фундазол» в экспозиции 10-15 минут, 70 % этанола в течение 30 секунд, 7 % гипохлорита кальция – 5-7 минут. Частота регенерации при этом составила 70 – 80 % в зависимости от сорта. Установлено, что наибольшим коэффициентом размножения характеризовались сорта: Грушенька (6,1-6,7), Берилл (3,1-4,9) и Черномор (3,5-4,5). На этапе собственно микроразмножения оптимальным

оказалось использование питательной среды с минеральным составом по прописи QL, содержащей 30 г/л сахарозы, 0,8 мг/л 6-БАП и 0,01 мг/л ИУК. При культивировании исследуемых сортов крыжовника определено, что наиболее жизнеспособными эксплантами являлись конгломераты из 3-4 микропобегов. Для снижения токсического действия веществ фенольной природы эффективным было культивирование эксплантов при температуре 16-18 °С. Применение 1,0 мг/л ИМК на этапе укоренения эффективно влияло на формирование корневой системы у эксплантов крыжовника. Для успешной адаптации и дальнейшего развития регенератов в условиях *ex vitro* оптимальным было использование почвенного субстрата, состоящего из торфа и мха сфагнума.

Список использованной литературы

1. Толстогузова В. Г. Земляника садовая и крыжовник в Нечерноземье. М: ФГБНУ ВСТИСП, 2017, 180 с.
2. Доронина А. Ю., Терехина Н. В. *Ribes uva-crispa* L. Крыжовник обыкновенный. Агроэкологический атлас России и сопредельных государств: экономически значимые растения, их вредители, болезни и сорные растения, 2008, URL: http://www.agroatlas.ru/ru/content/cultural/Ribes_uva-crispa_K. Ссылка активна на 11.07.2020.
3. Кухарчик Н. В., Кастрицкая М. С., Семенас С. Э., Колбанова Е. В., Красинская Т. А., Волосевич Н. Н., Соловей О. В., Змушко А. А., Божидай Т. Н., Рундя А. П., Малиновская А. М. Размножение плодовых растений в культуре *in vitro*. Минск: Белорусская наука, 2016, 235 с.
4. Магушкин С. А., Ярмоленко Л. В. Влияние различных цитокининов на пролиферацию крыжовника и малины *in vitro*. Плодоводство и ягодоводство России. 2014;38(2):7-12.
5. Jones O. P., Vine S. J. The culture of gooseberry shoot tips for eliminating virus. *Journal of Horticultural Science*. 1986;43(3):289-292.
6. Сковородников В. Н. Совершенствование клонального микроразмножения крыжовника. Вестник орловского государственного аграрного университета. 2012;6(39):24-26.
7. Бунцевич Л. Л., Беседина Е. Н., Костюк М. А., Макаркина М. В. Разработка составов питательных сред для интродукции в культуру *in vitro* эксплантов сортов малины и крыжовника. Плодоводство и виноградарство Юга России. 2014;28(4):46-55.
8. Preece J. E., Sutter E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *Micropropagation*. 1991: p. 71-93.
9. Аладина О. Н., Акимова С. В., Дубровская С. О., Батрак Е. Р., Аладин С. А. Адаптация микрорастений малины (*Rubus* L.) и сирени (*Syringa* L.) к нестерильным условиям. Известия ТСХА. 2009;3:98-109.
10. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999, 160 с.
11. 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 ГBS РАН. 2015;201(2):78-82.

12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(43):473-497.
13. Quoirin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae*. 1977;78:437-442.
14. Матушкина О. В., Пронина Л. В., Ярмоленко И. Н., Матушкин С. А. Влияние минерального состава питательной среды на морфогенез садовых растений *in vitro*. *Достижения науки и техники АПК*. 2014;1:41-42.
15. Молканова О. И., Королева О. В., Стахеева Т. С., Крахмалева И. Л., Мелешук Е. А. Совершенствование технологии клонального микроразмножения ценных плодовых и ягодных культур для производственных условий. *Достижения науки и техники АПК*. 2018;32(9):66-69. DOI: 10.24411/0235-2451-2018-10915.
16. Муратова С. А., Шорников Д. Г., Янковская М. Б. Размножение садовых культур *in vitro* (методические рекомендации). Мичуринск-научоград РФ: ВНИИГ и СПР им. И. В. Мичурина, 2008, 69 с.
17. Колбанова Е. В. Подбор минерального и гормонального состава питательной среды для культивирования сортов крыжовника в культуре *in vitro*. *Плодоводство*. 2013;25:284-294.
18. Wainwright H., Flegmann A. W. The micropropagation of gooseberry (*Ribes uva-crispa* L.): II. *In vitro* proliferation and *in vivo* establishment. *Journal of Horticultural Science*. 1985;60(4):485-491. DOI: 10.1080/14620316.1985.11515655.
19. Божидай Т. Н. Ризогенез и адаптация регенерантов голубики. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2018;49(1):162-169.

I. L. Krakhmaleva, O. I. Molkanova

N. V. Tsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences,
Russia, Moscow

PECULIARITIES OF *IN VITRO* PROPAGATION OF GOOSEBERRY VARIETIES

* * *