

УДК 634.7 (470.32)

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ЖИМОЛОСТИ

Д.М. Брыксин. С.А. Колесников
Научно-производственный центр «Агропищепром»

Резюме. В результате исследований выявлены особенности влияния состава питательной среды, площади питания, способов размещения растений на рост и развитие микропобегов различных сортов жимолости. Установлено, что коэффициент размножения зависит как от сортовых особенностей, так и площади питания растений.

Ключевые слова: микроклональное размножение, жимолость, in vitro, питательная среда, эксплант.

Optimization of honeysuckle microclonal propagation technology

Bryksin D.M., Kolesnikov S.A.
Scientific-productiv centre «Agropishcheprom»

Summary. As a result of the research, the peculiarities of the influence of the composition of the nutrient, plant nutrition area, and the methods of plant placement on the growth and the development of micro shoots of various varieties of honeysuckle have been revealed. It was found that the reproduction coefficient depends on the both varietal characteristics and the experimental variants.

Key words: microclonal reproduction, honeysuckle, in vitro, nutrient environment, explant.

Введение. В последние годы возрос интерес к посадочному материалу жимолости, что объясняется не только высокой питательной ценностью и биохимическим составом её плодов, но и возможностью возделывания культуры в промышленных масштабах с полным циклом механизации. Продление сроков потребления свежих плодов до 4-5 месяцев, благодаря внедрению новых сортов со сверхпоздним сроком созревания и современных способов хранения плодов в регулируемой атмосфере, представляет огромный интерес для экономики и аграрного сектора РФ.

Проблемы в современном питомниководстве жимолости заключаются в отсутствии маточных насаждений новых перспективных сортов, использовании вегетативных способов размножения (отводки, черенкование), ограничивающих возможность масштабного производства посадочного материала. В связи с этим актуально использование метода размножения in vitro. Способ микроклонального размножения имеет ряд преимуществ в сравнении с традиционными методами размножения - это сокращение сроков получения посадочного материала, высокий коэффициент размножения и возможность оздоровления растений от патогенов [1, 2].

Вопросами оптимизации технологии микроклонального размножения ягодных культур уделяется немало внимания в работах Князевой И.В. [3], Адаева Н.А. (4), Шорникова Д.Г. [5] и других авторов. Отдельные этапы разработаны и для размножения жимолости in vitro [6, 7], однако в большинстве работ исследователи обращают внимание на возможность подбора и усовершенствования состава питательных сред в связи с сортовой спецификой на каждом этапе микроразмножения. Используемая в большинстве производственных лабораторий технология [8] не совершенна и затратная, что приводит к увеличению стоимости конечного продукта и делает его менее доступным для потребителя.

Целью наших исследований являлось совершенствование имеющейся технологии клонального микроразмножения жимолости путём подбора оптимальной концентрации регулятора роста, площади питания растений, способов размещения микрочеренков на питательной среде, использование технологического приема повторной срезки микрорастений в условиях *in vitro*.

Место, объекты и методика исследований

Исследования проводились в 2023-2024 гг в лаборатории клонального микроразмножения НППЦ Агропщепром. Объектами исследований являлись сорта жимолости: канадской селекции – Аврора (*L. turczaninowii* Pojark. x *L. kamtschatika* (Sevast.) Pojark.) x (*L. caerulea* subsp. *emphylocalyx* (Maxim) Plekhanova) и Российской селекции - Памяти Куминова (*L. kamtschatika* (Sevast.) Pojark.) и Мичуринское диво (*L. turczaninowii* Pojark.). В работе использовали питательную среду, соответствующую прописи MS. В качестве регулятора роста на этапе размножения применяли 6-БАП. Для начала процесса морфогенеза в качестве экспланта использовали органы растения, предварительно прошедшие стерилизацию. Повторность опыта трехкратная. Изолированные экспланты выращивали при освещении белыми люминесцентными лампами с интенсивностью 3 тыс. люкс, при 16 часовом фотопериоде, температуре +23°C и влажности воздуха 68%. Исследования проводили согласно методическим рекомендациям [9, 10].

Результаты и обсуждение

На этапе введения в культуру *in vitro* большинство растений мало требовательны к составу питательной среды, однако на этапе размножения способность генотипа к микроразмножению, количественный показатель которого называется коэффициентом микроразмножения, зависит от типа и концентрации регулятора роста, используемого в питательной среде. Широко применяемыми в биотехнологии растений являются три группы фитогормонов – ауксины, цитокинины и АКБ. В качестве цитокинина, повышающего пролифериацию растительных тканей в питательных средах, предназначенных для размножения, используется 6 – бензиламинопурин (6-БАП). Однако использование различных концентраций цитокининов может сопровождаться и негативными последствиями, приводящими к нарушению оптимального баланса массы надземной и подземной части растений [11].

В исследованиях по подбору оптимальной концентрации регулятора роста на этапе размножения применяли 6-БАП в соотношениях 0,5, 1,0 и 1,5 мг/л. Растения высаживались вертикально.

Анализ полученных данных показал различия в зависимости от концентрации росторегулирующего вещества. На этапе “собственно микроразмножения” наибольшее количество побегов формировалось при добавлении в питательную среду цитокинина 6-БАП в концентрации 1 мг/л и достигло в среднем 3,1 шт на одно растение. Это в 2,8 раза больше чем в контроле. С максимальным количеством побегов выявлен сорт Мичуринское диво (таблица 1).

Таблица 1. – Количество побегов жимолости (шт) в зависимости от сорта и концентрации 6-БАП.

Сорт	Концентрация (мг/л)				НСР 05
	Безгармональная (контр)	0,5	1,0	1,5	
Аврора	1,0	1,9	2,8	2,0	0,3
Мичуринское диво	1,2	2,5	3,4	2,3	0,1
Памяти Куминова	1,2	2,2	3,1	2,1	0,1

НСР 05	0,1	0,2	0,2	0,1	-
--------	-----	-----	-----	-----	---

Средняя длина побегов жимолости была наибольшей при концентрации цитокинина 6 БАП 1,0 мг/л и составила 3,6-4,3 см, что превысило контроль на 1,5-1,8 см (таблица 2).

Таблица 2. – Средняя длина побегов жимолости (см) в зависимости от сорта и концентрации 6-БАП.

Сорт	Концентрация (мг/л)				НСР 05
	Безгармональная (контр)	0,5	1,0	1,5	
Аврора	2,1	3,0	3,6	3,2	0,2
Мичуринское диво	2,0	3,3	3,5	3,6	0,2
Памяти Кумина	2,5	3,9	4,3	4,1	0,3
НСР 05	0,2	0,1	0,2	0,2	-

Использование цитокинина 6 БАП в концентрации 1,0 мг/л привело к увеличению числа междоузлий в 2,0-2,5 раза в сравнении с контролем, причём на сорте Памяти Кумина это было особенно выражено (таблица 3).

Таблица 3. – Среднее количество междоузлий на побеге жимолости (шт) в зависимости от сорта и концентрации 6-БАП.

Сорт	Концентрация (мг/л)				НСР 05
	Безгармональная (контр)	0,5	1,0	1,5	
Аврора	2,0	3,0	4,0	3,0	0,5
Мичуринское диво	2,0	4,0	4,0	3,0	0,4
Памяти Кумина	2,0	4,0	5,0	4,0	0,4
НСР 05	0,3	0,4	0,4	0,4	-

В технологии размножения растений методом *in vitro* не маловажное значение имеет коэффициент размножения, который определяется как видовыми и сортовыми особенностями, так и правильно подобранному составу питательной среды [12 - 14]. В наших исследованиях максимальный положительный эффект по коэффициенту размножения изучаемых сортов достигнут в варианте с использованием 6 БАП в концентрации 1,0 мг/л (таблица, 4). Так же выявлены и сортовые различия по данному показателю во всех вариантах опыта с превосходством по сорту Памяти Кумина.

Таблица 4. – Коэффициент размножения у сортов жимолости в зависимости от вариантов опыта.

Сорт	Концентрация (мг/л)				НСР 05
	Безгармональная (контр)	0,5	1,0	1,5	
Аврора	2,8	5,2	6,9	5,4	1,2
Мичуринское диво	2,5	6,0	8,0	6,7	1,0

Памяти Куминова	3,1	7,9	9,0	8,5	1,9
НСР 05	0,1	0,5	0,3	0,3	-

При изучении влияния площади питания микрорастений жимолости использовали питательную среду, соответствующую прописи MS. В качестве регулятора роста на этапе размножения применяли вариант 6-БАП в концентрации 1,0 мг/л. Вариантами опыта являлись посадка в колбы по 9 растений (площадь питания одного растения 6,3 см²), 12 растений (площадь питания одного растения 4,7 см²), 15 растений (площадь питания одного растения 3,8 см²). Растения высаживались вертикально.

Биометрические показатели различались в зависимости от различных вариантов опыта. На этапе “собственно микроразмножения” наибольшее количество побегов формировалось во втором варианте опыта при площади питания на 1 растение равном 4,7 см². и достигло 2,0 – 2,7 шт. С максимальным количеством побегов выявлен сорт Мичуринское диво (таблица 5).

Таблица 5. – Количество побегов жимолости (шт.) в зависимости от сорта и площади питания.

Сорт	Площадь питания (см ² ./раст.)			НСР 05
	6,3	4,7	3,8	
Аврора	0,7	2,0	1,0	0,3
Мичуринское диво	1,0	2,7	1,0	0,2
Памяти Кумина	1,3	2,3	1,0	0,1
НСР 05	0,2	0,2	-	-

Средняя длина побегов жимолости была наибольшей во втором варианте с площадью питания 4,7 см²./раст. и составила 3,2-6,1 см. (таблица 6).

Таблица 6. – Средняя длина побегов жимолости (см.) в зависимости от сорта и площади питания.

Сорт	Площадь питания (см ² ./раст.)			НСР 05
	6,3	4,7	3,8	
Аврора	2,7	3,2	2,9	0,1
Мичуринское диво	4,6	6,1	4,7	0,2
Памяти Кумина	2,8	4,3	4,0	0,3
НСР 05	0,3	0,4	0,3	-

Использование различных вариантов опыта с изменением площади питания растений не привело к значительным изменениям по числу междоузлий на побегах изучаемых сортов жимолости (таблица 7).

Таблица 7. – Среднее количество междоузлий на побеге жимолости (шт.) в зависимости от сорта и площади питания.

Сорт	Площадь питания (см ² ./раст.)			НСР 05
	6,3	4,7	3,8	
Аврора	3	4	3	0,1
Мичуринское диво	4	4	3	0,2
Памяти Кумина	3	3	3	-
НСР 05	0,4	0,2	-	-

Коэффициент размножения изучаемых сортов не имел значительных отличий по различным вариантам опыта (таблица 8). Однако, выявлены и сортовые различия по данному показателю с превосходством по сорту Мичуринское диво.

Таблица 8. – Коэффициент размножения у сортов жимолости в зависимости от площади питания.

Сорт	Площадь питания (см ² ./раст.)			НСР 05
	6,3	4,7	3,8	
Аврора	2,3	2,8	1,9	0,2
Мичуринское диво	3,4	3,9	3,1	0,1
Памяти Кумина	3,1	2,8	2,5	0,3
НСР 05	0,4	0,2	0,2	-

Уплотненная посадка растений позволила увеличить выход микрорастений с 1 колбы до 38,0-45,7 шт. причём по сорту Мичуринское диво это было наиболее выражено (таблица 9).

Таблица 9. – Выход микрорастений жимолости (шт.) в зависимости от площади питания.

Сорт	Площадь питания (см ² ./раст.)			НСР 05
	6,3	4,7	3,8	
Аврора	20,6	34,0	42,3	4,4
Мичуринское диво	31,3	34,3	45,7	2,0
Памяти Кумина	27,6	34,0	38,0	1,9
НСР 05	1,1	0,1	1,6	-

С целью увеличения коэффициента размножения сортов жимолости нами были заложены опыты по размещению черенков при посадке на питательную среду и получены неоднозначные результаты. Вариантами опыта явились вертикальное (рисунок 1) и горизонтальное (рисунок 2) размещение растений на питательной среде.

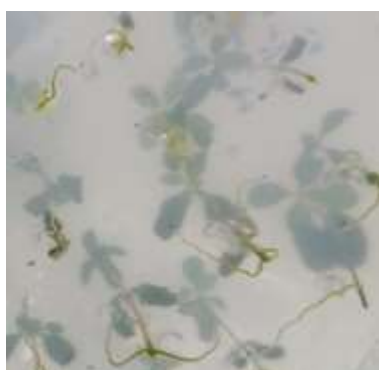


Рисунок 1. – Вертикальное размещение микрочеренков сорта Аврора.



Рисунок 2. – Горизонтальное размещение микрочеренков сорта Аврора

Биометрические показатели различались в зависимости от способа размещения микрочеренков на питательной среде. На этапе “собственно микроразмножения” наибольшее количество побегов формировалось при горизонтальном размещении и достигло в среднем 6,3 шт на одно растение. Это в 2,0 раза больше чем в варианте с вертикальным размещением побегов. С максимальным количеством побегов выявлен сорт Мичуринское диво, который

как при вертикальном, так и горизонтальном размещении характеризовался высоким уровнем показателя (таблица 10, рисунок 3,4).

Таблица 10. – Количество побегов жимолости (шт) в зависимости от способа размещения микрочеренка.

Сорт	Способ размещения микрочеренка		НСР 05
	вертикальный	горизонтальный	
Аврора	2,8	5,9	0,2
Мичуринское диво	3,4	7,3	0,3
Памяти Куминова	3,1	5,8	0,2
НСР 05	0,2	0,3	-

Средняя длина побегов изучаемых сортов жимолости была наибольшей при горизонтальном размещении и составила 4,4 – 4,6 см, что превысило вариант с вертикальным размещением на 0,3 – 1,5 см (таблица 11).



Рисунок 3. – Вертикальное размещение микрочеренка сорта Мичуринское диво



Рисунок 4. – Горизонтальное размещение микрочеренка сорта Мичуринское диво

Таблица 11. – Средняя длина побегов жимолости (см) в зависимости от способа размещения микрочеренка.

Сорт	Способ размещения микрочеренка		НСР 05
	вертикальный	горизонтальный	
Аврора	3,6	4,9	0,2
Мичуринское диво	3,5	4,4	0,1
Памяти Куминова	4,3	4,6	0,1
НСР 05	0,2	0,1	-

По числу междоузлий существенных различий в изучаемых вариантах опыта отмечено не было (таблица 12).

Таблица 12. – Среднее количество междоузлий на побеге жимолости (шт) в зависимости от способа размещения микрочеренка.

Сорт	Способ размещения микрочеренка		НСР 05
	вертикальный	горизонтальный	
Аврора	4,0	4,0	0,1

Мичуринское диво	4,0	4,0	0,1
Памяти Кумина	5,0	6,0	0,2
НСР 05	0,4	0,2	-

Максимальный положительный эффект по коэффициенту размножения изучаемых сортов достигнут в варианте с горизонтальным размещением микрочеренков (таблица 13). Так же выявлены и сортовые различия по данному показателю во всех вариантах опыта с превосходством по сорту Памяти Кумина.

Таблица 13. – Коэффициент размножения у сортов жимолости в зависимости от способа размещения микрочеренка.

Сорт	Способ размещения микрочеренка		НСР 05
	вертикальный	горизонтальный	
Аврора	6,9	11,8	1,5
Мичуринское диво	8,0	12,4	1,1
Памяти Кумина	9,0	13,1	1,2
НСР 05	0,3	0,2	-

С целью снижения себестоимости микрорастений нами были заложены опыты по числу срезов микропобегов с 1 микрорастения. В данном опыте использовали питательную среду, соответствующую прописи MS. В качестве регулятора роста на этапе размножения применяли вариант 6-БАП в концентрации 1,0 мг/л. Растения высаживались горизонтально в пластиковые контейнеры по 25 растений. Повторность опыта трёхкратная. В работе использовали 3 срезки растений с периодичностью 35 дней. Опыты выполнялись в стерильных условиях в ламинарном боксе.

Первая срезка выполнялась через 35 дней после высадки микрорастений на питательную среду. После срезки растения герметично упаковывались и помещались на световой стеллаж для дальнейшего отрастания. Аналогичная работа выполнялась после второй и третьей срезки. Наибольшее количество побегов формировалось после первой срезки (таблица 14).

Таблица 14. – Биометрические показатели сорта жимолости Мичуринское диво при выращивании *in vitro* в зависимости от варианта опыта.

Показатель	Возраст маточного растения			НСР 05
	1 срезка (35 дней)	2 срезка (70 дней)	3 срезка (105 дней)	
Количество побегов, шт/растение	7,0	6,0	5,0	0,5
Суммарная длина прироста сорта, см/растение	18,0	35,0	12,0	4,7
Коэффициент размножения	13,3	12,4	8,3	1,8

Средняя длина побегов жимолости была наибольшей во втором варианте при второй срезке микропобегов и составила 35,0 см. Коэффициент размножения сорта жимолости Ми-

чуринское диво был максимальным при первой и второй срезках микропобегов. При третьей срезке отмечено значительное снижение ростовой активности микропобегов, старение растений в связи с нехваткой питательных элементов в среде.

Заключение

В технологии клонального микроразмножения жимолости целесообразно использовать питательную среду по прописи MS. В качестве регулятора роста на этапе размножения применять 6-БАП в концентрации 1,0 мг/л. Посадка растений на питательную среду с площадью питания одного растения 3,8 см² позволит получить максимальное количество клонов с единицы площади, а использование горизонтального размещения микрочеренков при посадке способствует повышению коэффициента размножения на этапе пролиферации в сравнении с вертикальным размещением в 1,5-1,7 раза. Использование технологического приема повторной срезки микропобегов позволит сэкономить рабочую силу, время и затраты на расходные материалы (химреактивы, контейнеры) тем самым увеличив уровень рентабельности производства посадочного материала жимолости.

Список литературы

1. Калашикова Е.А. Клеточная инженерия растений: учебное пособие /Е.А. Калашикова. – М.: Изд.-во РГАУ – МСХА, 2012. – 318 с.
2. Иванова – Ханина, Л.В. Основы биотехнологии растений: клеточные технологии в селекции и размножении: учебное пособие /Л.В.Иванова – Ханина. - Симферополь: ИТ “Ариал”, 2015. – 144 с.
3. Князева И.В. Элементы оптимизации технологии сохранения смородины черной in vitro / И.В. Князева, В.Н. Сорокопудов, О.А. Сорокопудова – Вестник Крас ГАУ, 2020. – №6. – С.48-55.
4. Адаев Н.Л. Оптимизация питательных сред для клонального микроразмножения in vitro новых сортов ягодных культур. /Н.Л. Адаев, А.С. Магомедов, А.Г. Маева, А.Х. Занилов, М.Х. Хамзатова/ Инновационная деятельность как фактор развития АПК в современных условиях. Мат. II междунар. науч. конф. посвящ. 75 – летию ФГБНУ “Чеченский НИИСХ”, Грозный, 2020. – С.83-89.
5. Шорников Д.Г. Оптимизация условий культивирования in vitro ягодных и декоративных культур /Д.Г. Шорников, С.А. Брюхина, С.А. Муратова, М.Б. Янковская, Р.В. Папихин.// Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки, 2010. - Т.15. – № 2. С.640-645.
6. Куликова Е.И. Особенности культивирования Российских и зарубежных сортов жимолости съедобной (*Lonicera edulis* Turcz.) in vitro. /Е.И. Куликова, С.С. Макаров, И.Б. Кузнецова, А.И. Чудецкий// Техника и технология пищевых производств, 2021. – Т.51. – №4. – С.712-722.
7. Сучкова С.А. Подбор оптимальных концентраций регуляторов роста при клональном микроразмножении жимолости Алтайского государственного агроуниверситета, 2022. - №9 (215). – С.24-30.
8. Боровая С.А. Способ микроклонального размножения жимолости in vitro/ С.А. Боровая, Т.И. Хоружева, Н.Г. Богинская, С.И. Кухтина//Патент на изобретение RU 2807118 C1, 09.11.2023. Заявка от 04.05.2023.
9. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
10. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
11. Романов Г.А. Ауксины и цитокинины в развитии растений. / Г.А. Романов, С.С. Медведев // Последние достижения в исследовании фитотронов. 2-й междунар. симп. Прага, 2005 г. Физиология растений - 2006. – Т.53. - №2. – С.309-319.
12. Озеровский А.В. Микроклональное размножение селекционных форм ремонтантной малины с использованием новых регуляторов роста: автореферат дис... кандидата сельскохозяйственных наук : 06.01.05 / А.В. Озеровский - Брянск; 2007 - 17с.
13. Муратова С.А. Оптимизация методов клонального микроразмножения садовых культур / С.А. Муратова, М.Б. Янковская, Н.В. Соловых, Д.Г. Шорников, А.В. Будаговский, Р.В. Папихин // Плодоводство и ягодоводство России. – 2011. - Т. 26. - С. 375-382.
14. Wenhao D. Micropropagation of ‘Amethyst’ Purple Raspberry (*Rubus occidentalis* L. x *R. idaeus* L. ‘Amethyst’). / D. Wenhao, A. V. Magnusson, H. Hatterman-Valenti, J. F. Carter.// Environ. Hort. – 2006. - 24(1). - P.35-38.

Колесников Сергей Александрович, кандидат с.-х. наук, исполнительный директор Научно-производственного Центра «Агропищепром»

393761, Тамбовская область, г. Мичуринск-наукоград РФ, ул. Советская д. 286

Телефон: 8(47545) 5-09-80

E-mail: agropit@mail.ru

Брыксин Дмитрий Михайлович, канд. с.-х. наук, директор Научно-исследовательского центра Садоводства имени И.В. Мичурина (НПЦ "Агропищепром")

393761, Тамбовская область, г. Мичуринск-наукоград РФ, ул. Советская д. 286

Телефон: 8(47545) 5-14-13

E-mail: agropit@mail.ru