

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* АКТИНИДИИ (*ACTINIDIA LINDL.*)

М. Д. МОРОЗОВА

РУП «Институт плодоводства»,
ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь

АННОТАЦИЯ

С целью отработки элементов методики микроразмножения актинидии было выбрано по 2 сорта мужской формы (Камандор, Прывабны) и женской формы (Сентябрьская, Превосходная). В качестве первичных эксплантов использовали верхушки побегов у мужских форм и почки одревесневших побегов мужской и женской форм. Регенерационная способность эксплантов актинидии на этапе введения в культуру *in vitro* зависела от генотипа растения и вида выбранного экспланта: высокой жизнеспособностью характеризовались экспланты мужских форм актинидии (сорта Прывабны и Камандор) при использовании верхушек побегов – 66,66–100 %, вегетативных почек – 16,66–80,00 %. В то же время для женских форм – 10,00–22,73 %. Подобрана схема стерилизации. Отмечен длительный период стабилизации на первых пассажах, отсутствие закладки побегов и их роста. Коэффициент размножения у мужских форм в среднем по пассажам составил 2,7, в то время как у женских форм – 1,4. Замена источника углевода и изменение состава регуляторов роста позволило увеличить коэффициент размножения у мужских форм в полтора раза.

Ключевые слова: актинидия, мужские и женские формы, культура *in vitro*, питательная среда, источники углевода, микроразмножение, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее распространены в Беларуси три вида актинидии: *Actinidia kolomikta*, *A. arguta* и *A. polygama*. В пределах каждого из этих видов имеются культурные сорта.

В настоящее время значительно возрос интерес к нетрадиционным культурам плодовых и ягодных растений, отличающихся, с одной стороны, высоким содержанием природных антиоксидантов и биологически активных веществ, с другой – привлекательными декоративными характеристиками. К таким популярным растениям относится и ягодная лиана умеренных широт – актинидия. До недавних пор основным способом размножения сортов и отборных форм актинидии были зеленые и одревесневшие черенки. Вегетативное размножение дает возможность полностью передавать сортовые свойства материнского растения, гарантирует пол саженцев и обеспечивает относительно быстрое вступление растения в плодоношение [1].

Для своевременного удовлетворения потребительского спроса на новые виды и сорта необходимо вместе с традиционными способами размножения широко внедрять новые технологии производства посадочного материала, в частности микроразмножение [1].

Велика ценность актинидии и как декоративного растения для вертикального озеленения беседок, стен, заборов. Актинидия быстро растет, хорошо формируется и стрижется [2].

Базовая коллекция актинидии в отделе ягодных культур РУП «Институт плодоводства» в настоящее время представлена тремя видами: *A. kolomikta*, *A. arguta* и *A. polygama* и рядом сортов (Ласунка, Киевская крупноплодная, Превосходная и др.).

В 2007 г. сорта Киевская крупноплодная, полученный на основе *A. arguta*, и Превосходная, производный от *A. kolomikta*, включены в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь для приусадебного возделывания. В 2017 г. районированы также мужские сорта-опылители Камандор (*A. arguta*), Прывабны (*A. kolomikta*) [3, 4].

Цель исследования – изучение особенностей введения и размножения *in vitro* мужских и женских форм актинидии.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа по введению в культуру *in vitro* сортов актинидии двух видов *A. arguta*, *A. kolomikta* проведена в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства».

Для проведения исследований использовали методику микроразмножения подвоев яблони *in vitro* [5], методику микроразмножения смородины черной *in vitro* [6].

Объекты исследования – сорта актинидии, произрастающие в отделе ягодных культур РУП «Институт плодоводства»:

мужские формы: Камандор (*A. arguta*), Прывабны (*A. kolomikta*);

женские формы: Сентябрьская (*A. arguta*), Превосходная (*A. kolomikta*).

Камандор (*A. arguta*). Сорт средней зимостойкости, мужское растение-опылитель. Обладает хорошей сопротивляемостью к заболеваниям и прочим вредителям. Лиана с мощными побегами, достигающими 20 м в высоту. Окраска коры светло-серая. Листья широкоовальной или яйцевидной формы с заостренной верхушкой. Пластинка листа плотная, блестящая, темно-зеленая сверху и матовая светло-зеленая с нижней стороны на тонких черешках длиной около 7 см. Цветки чашевидной формы с 5 лепестками диаметром 2–3 см. Окраска – белая с зеленоватым оттенком [7].

Прывабны (*A. kolomikta*). Мужской сорт-опылитель. Обладает устойчивостью к грибным болезням и вредителям. Лиана высотой до 8 м. Окраска коры красно-коричневая с шелушением. Листья цельные, яйцевидные. Листовая пластинка сверху темно-зеленая с редким опушением по жилкам, снизу – грязно-зеленая. Характерно явление пестролистности – перед цветением верхушка листа белеет, затем приобретает малиновую окраску. Цветки блюдцевидные с 5 лепестками белого цвета, диаметром до 2 см, собраны в соцветия по 2–3 шт. [7].

Сентябрьская (*A. arguta*). Сорт созревает в сентябре, обладает морозоустойчивостью до –30 °С, высокой и стабильной урожайностью – 10–12 кг с куста, самобесплодный, требует опылителя. Лиана достигает до 20 м в высоту. Плодоношение начинается через 2–3 года после посадки. Сорт устойчив к болезням и вредителям. Плоды эллиптические, гладкие, насыщенного зеленого цвета, крупные, массой 10–20 г, сочные. Вкус сладкий с ананасным ароматом [7].

Превосходная (*A. kolomikta*). Сорт зимостойкий, среднеурожайный (2,5 кг с куста). Созревание не дружное, при созревании плоды осыпаются. Самобесплодный, требует опылителя. Лиана высотой до 8 м, толщиной до 2 см у основания. Вступает в плодоношение на 3–4-й год после посадки. Обладает относительной устойчивостью к грибным болезням. Плоды цилиндрической формы, темно-зеленые, средние по размеру (2,5 г). Поверхность ребристая. Вкус кисло-сладкий [7].

Определение срока изоляции и типа эксплантов. Для введения в культуру *in vitro* в качестве эксплантов использовали верхушки побегов у мужских форм и почки одревесневших побегов мужской и женской форм в период начала плодообразования и налива плодов (август).

Стерилизация эксплантов. В качестве основного стерилизующего агента использовали 30%-ный раствор перекиси водорода. Последовательность стерилизации в зависимости от выбранного экспланта проводили по следующим схемам:

1) для верхушек (в нестерильных условиях): промывка проточной водой (40 мин); обработка фунгицидом «Хорус» (15 мин); промывка в ламинар-боксе автоклавированной дистиллированной водой до прозрачности; обработка 70%-ным этанолом (30 с); обработка 33%-ной перекисью водорода (3 мин); промывка автоклавированной дистиллированной водой до исчезновения пены, меняя воду 4 раза (15 мин);

2) для почек (в нестерильных условиях): промывка проточной водой (40 мин); обработка фунгицидом «Хорус» (15 мин); промывка в ламинар-боксе автоклавированной дистиллированной водой до прозрачности; обработка 70%-ным этанолом (30 с); обработка 33%-ной перекисью водорода (5 мин); промывка автоклавированной дистиллированной водой до исчезновения пены, меняя воду 4 раза (15 мин).

Для введения эксплантов в культуру *in vitro* использовали следующие питательные среды:

1) по прописи Мурасиге и Скуга (MS) [8] с добавлением 1,1 мг/л 6-бензиладенина (6-БА), 0,09 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК), 0,8 мг/л тиамин гидрохлорида (В₁), 0,8 мг/л пиридоксина гидрохлорида (В₆), 1,0 мг/л никотиновой кислоты (РР), 30 г/л сахарозы, 5,5 г/л агара (рН 5,7–5,8);

2) по прописи Мурасиге и Скуга [8] с добавлением 1,0 мг/л 6-БА, 0,2 мг/л ГК, 0,01 мг/л ИМК, 0,5 мг/л В₁, 0,5 мг/л В₆, 0,5 мг/л РР, 1,0 мг/л аскорбиновой кислоты (С), 30 г/л сахарозы, 4,4 г/л агара (рН 5,6–5,7);

3) $1/2$ макросоли и хелата железа по прописи Мурасиге и Скуга [8] с добавлением 0,25 мг/л ИМК, 0,5 мг/л V_1 , 0,5 мг/л V_6 , 0,5 мг/л РР, 30 г/л сахарозы, 4,4 г/л агара (рН 5,6–5,7);

4) $1/2$ макросоли и хелата железа по прописи Мурасиге и Скуга [8] с добавлением 0,7 мг/л ИМК, 0,5 мг/л V_1 , 0,5 мг/л V_6 , 0,5 мг/л РР, 1,0 мг/л С, 15 г/л сахарозы, 4,4 г/л агара (рН 5,7–5,75).

Для микроразмножения использовали питательные среды в следующих вариантах:

1) на первом пассаже для сорта Прывабны: по прописи Мурасиге и Скуга [8] с концентрацией 6-БА – 0,5 мг/л, ГК – 1 мг/л, ИМК – 0,01 мг/л, витаминов V_1 , V_6 , РР – по 0,5 мг/л, 30 г/л сахарозы, 4,4 г/л агара (рН 5,6–5,7);

2) на первом пассаже для сортов Камандор, Сентябрьская, Превосходная и на втором пассаже для сорта Прывабны: по прописи Мурасиге – Скуга [8] с концентрацией 6-БА – 0,5 мг/л, ГК – 1 мг/л, витаминов V_1 , V_6 , РР – по 0,5 мг/л, витамина С – 1,0 мг/л, 30 г/л сахарозы, 4,4 г/л агара (рН 5,6–5,7);

3) на втором пассаже для сортов Камандор, Сентябрьская, Превосходная и третьем пассаже для сорта Прывабны: по прописи Мурасиге – Скуга [8] с концентрацией 6-БА – 0,3 мг/л, ГК – 1 мг/л, витаминов V_1 , V_6 , РР – по 0,5 мг/л, витамина С – 1,0 мг/л, 30 г/л сахарозы, 4,4 г/л агара (рН 5,6–5,7);

4) на третьем пассаже для сортов Камандор, Сентябрьская, Превосходная и четвертом пассаже для сорта Прывабны: по прописи Мурасиге – Скуга [8] с концентрацией 6-БА – 0,5 мг/л, витаминов V_1 , V_6 , РР – по 0,5 мг/л, витамина С – 1,0 мг/л, 30 г/л глюкозы, 3,8 г/л агара (рН 5,6–5,7);

5) на четвертом пассаже для сорта Прывабны: по прописи Мурасиге и Скуга [8] с концентрацией 6-БА – 0,5 мг/л, витаминов V_1 , V_6 , РР – 0,5 мг/л, витамина С – 1,0 мг/л, 15 г/л глюкозы, 15 г/л сахарозы, 3,8 г/л агара (рН 5,6–5,7).

В качестве основного углевода на этапе введения *in vitro* и первых трех пассажей использовали сахарозу, далее в качестве углевода стали использовать глюкозу и смесь сахарозы и глюкозы в соотношении 1:1.

Условия культивирования актинидии *in vitro*: освещение 2,5–3 тыс. лк, температура +21...+23 °С, фотопериод 16/8 ч. Длительность этапа введения – 5 недель. Длительность этапов микроразмножения – 8 недель.

Обработку данных и построение графика проводили в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Важным условием успешного введения в культуру *in vitro* является срок изоляции, тип экспланта и стерильность проведения работ. Отбор материала для введения в культуру проводили в августе. Эксплантами для введения в культуру *in vitro* служили вегетативные почки и верхушки побегов.

В результате проведенного исследования высокой жизнеспособностью характеризовались экспланты мужских форм актинидии (сорта Прывабны и Камандор) при использовании верхушек побегов. Количество жизнеспособных эксплантов сорта Прывабны составило 66,66 % на среде MS с 1,1 мг/л 6-БА и 91,66 % на среде MS с 1,0 мг/л 6-БА, 0,2 мг/л ГК, 0,01 мг/л ИМК; сорта Камандор – 100 % на среде MS с 1,1 мг/л 6-БА.

При использовании почек получено меньшее количество жизнеспособных эксплантов: на среде MS с 1,0 мг/л 6-БА; 0,2 мг/л ГК; 0,01 мг/л ИМК – 50 % – у сорта Прывабны, 16,66 % – сорта Камандор, 14,29 % – сорта Сентябрьская, 12,5 % – сорта Превосходная; на модифицированной среде $1/2$ MS с 0,7 мг/л ИМК – 22,73 % – у сорта Сентябрьская, 10 % – сорта Превосходная.

Наибольшим количеством жизнеспособных эксплантов (80 %) характеризовались почки сорта Камандор на среде MS с 1,1 мг/л 6-БА. На модифицированной среде $1/2$ MS с 0,25 мг/л ИМК жизнеспособных эксплантов не отмечено. После нулевого пассажа (5 недель) регенераты изучаемых сортов были пересажены на питательную среду для этапа микроразмножения.

После трех пассажей этапа микроразмножения было отмечено, что темпы развития эксплантов изучаемых сортов актинидии существенно менялись в процессе культивирования. На этапе введения в стерильную культуру и на первых пассажах коэффициент размножения был ниже, чем на последующих. Необходимо также отметить, что при этом увеличение длительности пас-

сажей позволило повысить качество получаемых растений. Наибольшее количество хорошо развитых микропобегов было получено при длительности пассажа 60 дн., что было обусловлено достаточно длительным периодом стабилизации растений на этапе микроразмножения.

На коэффициент размножения оказывали влияние не только генетические особенности. Для поддержания устойчиво пролиферирующей культуры *in vitro* весьма существенным является правильный подбор и оптимальное соотношение регуляторов роста (цитокининов и ауксинов). В процессе исследования были выявлены оптимальные концентрации экзогенных гормонов на стадии размножения (II–IV пассаж).

В питательные среды для микроразмножения были добавлены такие гормоны роста, как 6-БА и ГК [9].

Добавление вышеперечисленных гормонов не вызвало активации роста в период стабилизации. Отмечено отсутствие роста побегов в течение 20 суток у *A. arguta* и до 30 сут у *A. kolomikta*, затем начинался рост побегов и формирование междоузлий с листьями. Кроме того, в месте среза микрочеренка наблюдался каллусогенез. Цвет каллуса отличался у мужских и женских форм растений: для мужской формы был характерен светло-зеленый цвет, в то время как для женской – буровато-зеленый.

У мужских форм актинидии сортов Прывабны и Камандор были отмечены более высокие коэффициенты размножения на протяжении трех пассажей по сравнению с таковыми у женских форм сортов Сентябрьская и Превосходная на протяжении двух пассажей. Коэффициент размножения у мужских форм в среднем по пассажам составил 2,7, в то время как у женских форм – 1,4 (рис. 1).

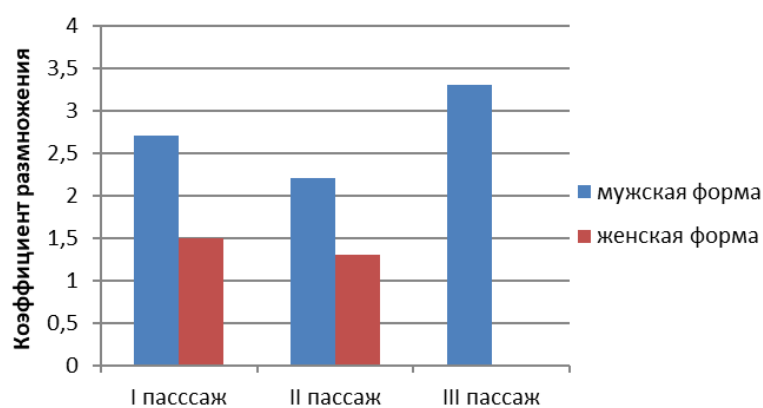


Рис. 1. Влияние длительности культивирования на коэффициент размножения мужской и женской форм актинидии *in vitro*

Для уменьшения периода стабилизации и увеличения коэффициента размножения изменяли состав питательной среды: добавляли регулятор роста 6-БА в концентрации 0,5 мг/л, а в качестве углеводов в первом варианте использовали 30 г/л глюкозы, во втором варианте – 15 г/л глюкозы и 15 г/л сахарозы.

После культивирования растений мужского сорта Камандор на пассаже III на среде с глюкозой в качестве углевода было отмечено, что период стабилизации уменьшился. Наблюдалось более активное формирование новых побегов и междоузлий с листьями, что существенно увеличило коэффициент размножения при культивировании в течение 8 нед., как и на предыдущих пассажах. Коэффициент размножения составил 4,3. Кроме того, растения отличались хорошо развитой корневой системой (рис. 2). Для женских форм сортов Сентябрьская и Превосходная после культивирования на пассаже III коэффициент размножения остался на прежнем уровне.

Растения мужского сорта Прывабны на пассаже IV были высажены на среду с глюкозой и сахарозой в соотношении 1:1. По сравнению с сортом Камандор, формирование новых побегов и междоузлий с листьями у эксплантов сорта Прывабны наблюдалось несколько позже, однако по прошествии 8 нед. за счет активного органогенеза после периода стабилизации был достигнут коэффициент размножения 4,25. Отмечалось также развитие корневой системы (рис. 3).



Рис. 2. Растения актинидии сорта Камандор на среде с 0,5 мг/л 6-БА и 30 г/л глюкозы

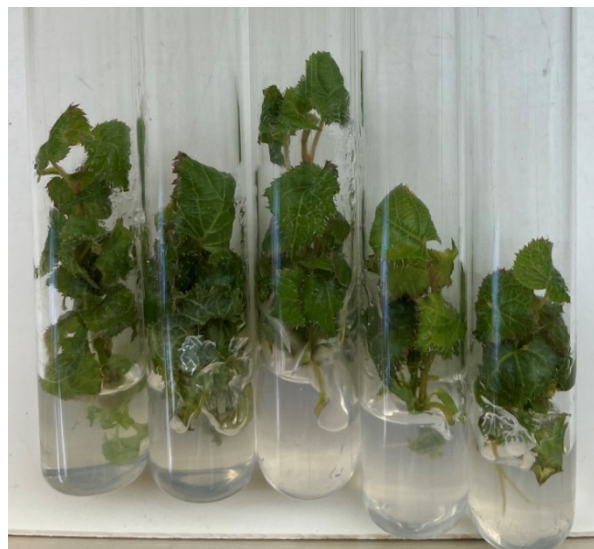


Рис. 3. Растения актинидии сорта Привабны на среде с 0,5 мг/л 6-БА, 15 г/л глюкозы и 15 г/л сахарозы

Добавление в качестве углевода глюкозы как единственного основного источника углевода, так и в соотношении 1:1 с сахарозой, позволило уменьшить период стабилизации эксплантов и увеличить коэффициент размножения у мужских форм сортов Привабны и Камандор. Так, средний коэффициент размножения у мужских форм увеличился с 2,7 до 4,3.

ВЫВОДЫ

Регенерационная способность эксплантов актинидии на этапе введения в культуру *in vitro* зависела от генотипа растения и вида выбранного экспланта: высокой жизнеспособностью характеризовались экспланты мужских форм актинидии (сорта Привабны и Камандор) при использовании верхушек побегов – 66,66–100 %, вегетативных почек – 16,66–80,00 %. В то же время для женских форм – 10,00–22,73 %. Подобрана схема стерилизации (в нестерильных условиях): промывка проточной водой (40 мин); обработка фунгицидом «Хорус» (15 мин); промывка в ламинар-боксе автоклавированной дистиллированной водой до прозрачности; обработка 70%-ным этанолом (30 с); обработка 33%-ной перекисью водорода (3 мин); промывка автоклавированной дистиллированной водой (15 мин).

Отмечен длительный период стабилизации на первых пассажах, отсутствие закладки побегов и их роста. Коэффициент размножения у мужских форм в среднем по пассажам составил 2,7, в то время как у женских форм – 1,4. Замена источника углевода и изменение состава регуляторов роста позволило увеличить коэффициент размножения у мужских форм в полтора раза.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Совершенствование метода клонального микроразмножения актинидии и лимонника китайского / С. А. Муратова [и др.] // Современное садоводство. – 2010. – № 1 (1). – С. 96–100.
2. Современный сортимент садовых насаждений Беларуси / РУП «Институт плодородия»; под ред. З. А. Козловской, В. А. Самуся. – Минск : Беларус. навука, 2015. – 265 с.
3. Фролова, Л. В. Агробиологические особенности актинидии в условиях Беларуси / Л. В. Фролова, Д. Б. Радкевич, М. Л. Пигуль // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сб. науч. ст. XXI Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 31 мая, 30 марта, 20 марта 2018 г. / Гродн. гос. аграр. ун-т. – Гродно, 2018. – С. 256–257.
4. Сорта плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда, включенные в Государственный реестр сортов и находящиеся на испытании в Государственной инспекции по испытанию и охране сортов растений / РУП «Ин-т плодородия»; отв. за вып. В. В. Васеха. – Самохваловичи : [б. и.], 2017. – 27 с.
5. Коновалова, Л. Н. Оценка ресурсного потенциала и оптимизация технологии клонального микроразмножения представителей семейства *Actinidiaceae* Van-Tiegh / Л. Н. Коновалова, Е. В. Малаева, О. И. Молканова // Вестн. КрасГАУ. – 2008. – № 6. – С. 42–46.

6. Малаева, Е. В. Биологические и молекулярно-генетические особенности дальневосточных видов рода *Actinidia* Lindl. : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.05 / Е. В. Малаева. – М., 2008. – 136 л.

7. Генофонд плодовых и ягодных растений Беларуси: атлас сортов плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда / З. А. Козловская [и др.] ; под общ. ред. З. А. Козловской, А. А. Таранова. – Минск : Беларус. навука, 2020. – 542 с.

8. Murashige, T. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

9. Bhatia, S. Plant Tissue Culture / S. Bhatia // *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* / S. Bhatia [et al.]. – Amsterdam ; Boston ; Heidelberg ; London ; New York ; Oxford ; Paris ; San Diego ; San Francisco ; Singapore ; Sydney ; Tokyo, 2015. – Chap. 2. – P. 31–107.

MICROPROPAGATION OF ACTINIDIA THROUGH *IN VITRO* CULTURE

M. D. MOROZOVA

Summary

In an effort to elaborate the elements of the actinidia micropropagation methodology, 2 varieties of the male form (Kamandor, Pryvabny) and the female form (Sentyabrskaya, Prevoshodnaya) were selected. The shoot tips of the male forms and buds of lignified shoots of the male and female forms were used as initial explants. The regenerative ability of actinidia explants at the stage of *in vitro* culture induction was defined by the plant genotype and the type of explant selected: explants of male forms of actinidia (Pryvabny and Kamandor varieties) were characterized by high viability when using shoot tips – 66.66–100 %, vegetative buds – 16.66–80 %. At the same time for female forms – 10–22.73 %. The sterilization scheme was chosen. A long period of stabilization in the first passages, the absence of shoot initiation and their growth were noted. The reproduction factor for male forms on average over passages was 2.7, while for female forms it was 1.4. The replacement of the carbohydrate source and the change in the composition of growth regulators made it possible to increase the reproduction rate in male forms by one and a half times.

Keywords: actinidia, male and female forms, *in vitro* culture, nutrient medium, carbohydrate sources, micropropagation, Belarus.

Поступила в редакцию 28.03.2022