

## РИЗОГЕНЕЗ *IN VITRO* И АДАПТАЦИЯ *EX VITRO* МУЖСКИХ ФОРМ АКТИНИДИИ (*ACTINIDIA LINDL.*)

М. Д. МОРОЗОВА

РУП «Институт плодоводства»,  
ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,  
e-mail: belhort@belsad.by

### АННОТАЦИЯ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2022 г. Объектами исследования были выбраны мужские формы актинидии двух видов: сорт Прывабны (*Actinidia kolomikta*) и сорт Камандор (*Actinidia arguta*). Оценивали результативность укоренения растений *in vitro*, морфометрические показатели растений после ризогенеза *in vitro* и на этапе адаптации *ex vitro*, а также результативность первого этапа адаптации (доля адаптированных растений). Проведен анализ влияния сортовых особенностей на морфометрические показатели растений. Микроразмножение на среде с 0,5 мг/л 6-БА, 15,0 г/л глюкозы и 15,0 г/л сахарозы позволило получить хорошо развитые экспланты с высокими показателями ризогенеза *in vitro* (97,3–99,1 %), готовые к высадке на этап адаптации. На этапе адаптации на субстрате торфа «Двина» с агроперлитом (3 : 1) у сорта Камандор получено в два раза больше адаптированных растений (89,30 % ± 0,63 %), чем у сорта Прывабны (42,80 % ± 1,55 %).

**Ключевые слова:** *Actinidia Lindl.*, актинидия, мужские формы, культура *in vitro*, питательная среда, субстрат, ризогенез *in vitro*, адаптация *ex vitro*, Беларусь.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальным является изучение малораспространенных культур, в том числе изучение всех этапов микроразмножения *in vitro*. Большое внимание отводится редким и ценным культурам для создания коллекций культур *in vitro* с целью сохранения биоразнообразия. Ягоды актинидии (*Actinidia Lindl.*) отличаются большим содержанием биологически активных веществ и витаминов, что вызывает интерес к внедрению биотехнологических методов для размножения и сохранения данной культуры [1].

В государственный реестр сортов для приусадебного возделывания включены такие виды актинидии, как *A. kolomikta* и *A. arguta*, из них сорта-опылители актинидии – Камандор и Прывабны, включенные в реестр в 2017 г. [2].

Завершающими этапами микроразмножения растений являются укоренение и адаптация пробирочных растений к нестерильным условиям.

Актинидия относится к культурам, относительно легко укореняемым в условиях *in vitro* [3]. Ризогенез *in vitro* растений актинидии отмечается как при культивировании на средах с добавлением ауксинов, так и на средах без ауксинов. Однако укорененные *in vitro* растения на средах с добавлением ауксинов имеют лучше развитую корневую часть, что обеспечивает уменьшение сроков адаптации [4].

Адаптация является завершающим и ключевым этапом клонального микроразмножения растений *in vitro*. Только отработка эффективной технологии перевода микрорастений в нестерильные условия делает возможным промышленное микроразмножение садовых культур. Неправильный выбор условий адаптации может свести на нет усилия, затраченные на всех предшествующих этапах микроразмножения. Перенос растений в нестерильные условия *in vivo* создает стрессовую ситуацию и приводит во многих случаях к их гибели [4–7].

Соблюдение всех особенностей этапа адаптации позволяет снизить потери размноженного материала актинидии до 5 % [8].

Исследования по адаптации различных садовых культур, проведенные И. А. Труновым и Ю. В. Хорошковой [4], показали, что для адаптации до 90–98 % растений актинидии оптимально использовать укорененные *in vitro* микрорастения, имеющие от 4 листьев и с хорошо развитой

корневой системой длиной от 1,5 см. Кроме того, рекомендуется поддержание 90 % влажности в течение первых двух недель адаптации; затем постепенно, в течение 10–14 дней, снижать влажность до 50–60 % и осуществлять снятие пленки полностью через 3,5–4 недели [4]. Учитывая биологические особенности культуры, исследователи также рекомендуют использовать для адаптации растений актинидии ячейки для высадки объемом не менее 60 мл [8].

В. А. Высоцкий, Л. В. Бартенева изучали особенности микроразмножения актинидии на примере *A. kolomikta* и *A. arguta*. Исследователи отмечали, что укорененные пробирочные растения актинидии легко переносят пересадку в нестерильные условия. Для пересадки В. А. Высоцкий и Л. В. Бартенева применяли индивидуальные пластиковые контейнеры, наполненные промытым речным песком, смесью торфа и песка, торфа и перлита в объемном отношении 2 : 1 [9].

В технологии адаптации актинидии острой (*A. arguta*) [10] для получения 100 % приживаемости рекомендовано использование в качестве субстрата смеси верхового нейтрального торфа с агроперлитом в соотношении 3 : 1, а также высадка растений в мини-парники. Рекомендуемыми сроками первого этапа адаптации являются следующие: 3 недели в контейнерах, закрытых скотчем, 2 недели физиологической преадаптации (после снятия скотча), 1 неделя физиологической адаптации (открытие крышки начиная с 10–15 мин в день с увеличением экспозиции, пониженная влажность), 2 недели доращивания без крышки. Во время доращивания в открытых контейнерах идет первая подкормка по корню азофоской. Далее растения высаживаются на второй этап адаптации – в горшки. На втором этапе адаптации рекомендуется использовать смесь торфа с перлитом в пропорции 4 : 1, а также проводить подкормку по листу [10].

Изучение особенностей ризогенеза и адаптации к условиям *ex vitro* растений актинидии разных видов и сортов позволит получить хороший выход адаптированных растений после культивирования *in vitro*. В связи с вышеизложенным, целью нашего исследования было изучение особенностей ризогенеза *in vitro* и адаптации *ex vitro* мужских форм актинидии (сорта Камандор и Прывабны).

## МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства».

Объекты исследования: мужские формы актинидии сортов Камандор (*A. arguta*) и Прывабны (*A. kolomikta*), произрастающие в отделе ягодных культур РУП «Институт плодоводства».

**Камандор** (*A. arguta*). Сорт средней зимостойкости, устойчив к заболеваниям и прочим вредителям. Лиана до 20 м в высоту. Окраска коры светло-серая. Листья широкоовальной или яйцевидной формы с заостренной верхушкой. Пластинка листа плотная, блестящая, темно-зеленая сверху и светло-зеленая с нижней стороны на тонких черешках длиной около 7 см. Цветки чашевидной формы с 5 лепестками диаметром 2–3 см [11].

**Прывабны** (*A. kolomikta*). Сорт устойчив 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. Характерна пестролистность (приобретение малиновой окраски листьями перед цветением). Цветки блюдцевидные с 5 лепестками диаметром до 2 см [11].

Экспланты культивировали на модифицированной питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга (MS) [12], с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиладенина (6-БА), 0,5 мг/л тиамина гидрохлорида (В<sub>1</sub>), 0,5 мг/л пиридоксина гидрохлорида (В<sub>6</sub>), 0,5 мг/л никотиновой кислоты (РР), 1,0 мг/л аскорбиновой кислоты (С), 15,0 г/л глюкозы, 15,0 г/л сахарозы, 3,8 г/л агара (рН 5,6–5,7).

Культивирование *in vitro* осуществлялось при освещении 2,5–3,0 тыс. лк, температура – +21...+23 °С, фотопериод – 16/8 ч. Длительность субкультивирования – 9 недель.

Адаптация растений проводилась в климатической комнате. Для первого этапа адаптации *ex vitro* растений-регенерантов использовали мини-теплицы 450 × 200 × 70 мм (расстояние между рядами – 20 мм), в качестве субстрата использовали смесь торфа «Двина» с агроперлитом в соотношении 3 : 1. Длительность первого этапа адаптации – 55 дней.

На втором этапе адаптации растения пересаживали в горшки объемом 50 мл в субстрат торф «Двина» с агроперлитом (3 : 1) и с добавлением удобрения «Осмокот».

Условия адаптации *ex vitro*: освещение 2,5–3,0 тыс. лк, температура – +21...+22 °С, фотопериод – 16/8 ч.

Оценка адаптации *ex vitro* проводилась по следующим показателям: доля адаптированных растений, %; количество побегов, шт.; длина побега, см; количество корней, шт.; длина корней, см; количество междоузлий, шт.

Статистическую обработку данных осуществляли в программе STATISTICA 6.0, используя ANOVA, однофакторный дисперсионный анализ. Построение графиков проводили в программе Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате культивирования *in vitro* было отмечено спонтанное укоренение растений-регенерантов на среде для размножения (среда без ауксинов). Это свидетельствует о высокой ризогенной способности эксплантов. Спонтанное укоренение в процессе культивирования отмечалось у побегов актинидии и другими авторами [9].

На данной среде были получены растения с хорошо развитой корневой системой. Ризогенез *in vitro* отмечен у 99,10 % ± 0,88 % растений сорта Прывабны и 97,30 % ± 1,34 % растений сорта Камандор (рис. 1).

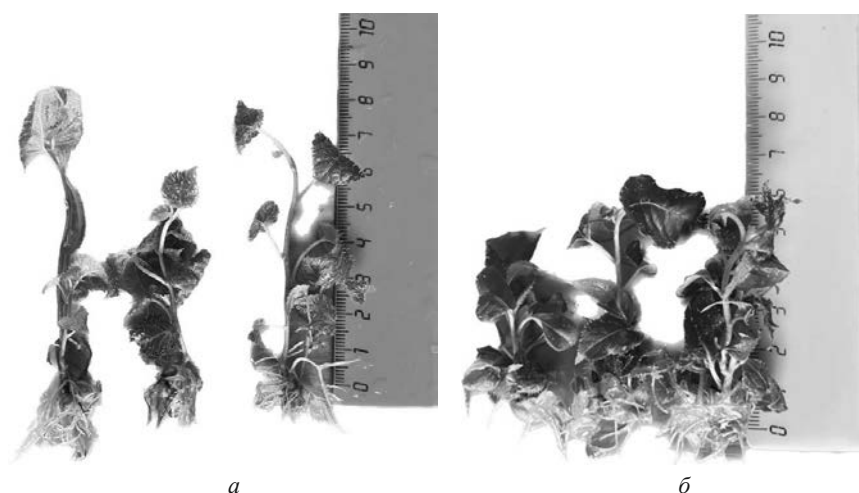


Рис. 1. Ризогенез в культуре *in vitro* на среде с 0,5 мг/л 6-БА, 15,0 г/л глюкозы и 15,0 г/л сахарозы:  
а – Прывабны (*A. kolomikta*); б – Камандор (*A. arguta*)

Было обнаружено влияние генотипа на параметры микроразмножаемых побегов актинидии на данном этапе. У сорта Прывабны отмечались высокие показатели по количеству корней (8,80 шт. ± 3,61 шт.), а также по длине побега и количеству междоузлий (4,26 см ± 0,99 см и 6,24 шт. ± 1,20 шт. соответственно). Растения сорта Камандор, в свою очередь, отличались большим количеством побегов (2,27 шт. ± 0,69 шт.), а также более высокими показателями длины корней (2,17 см ± 0,61 см). Таким образом, растения сорта Прывабны в культуре *in vitro* образовали меньше побегов и больше нарастали в длину, в то время как у растений сорта Камандор наблюдалась противоположная тенденция (рис. 2).

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ показал значимое влияние сортовых особенностей на длину побегов растений ( $p < 0,001$ ), а также на количество междоузлий, побегов и корней ( $p < 0,05$ ). При этом по показателю длины корней статистически значимой разницы между сортами не отмечено ( $p > 0,05$ ).

Для дальнейшей адаптации пробирочных растений к нестерильным условиям корни промывали в слабом растворе марганцовокислого калия для удаления остатков среды. Пересадка в мини-теплицы на первый этап адаптации обеспечивала поддержание 100%-ной влажности.

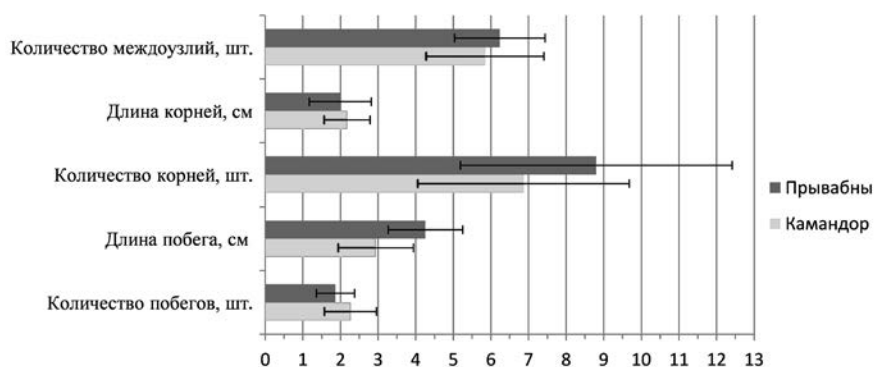


Рис. 2. Морфологические показатели укорененных *in vitro* растений-регенерантов мужских форм актинидии (среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение)

По результатам первого этапа адаптации *ex vitro* наибольшая доля адаптированных растений была отмечена у сорта Камандор –  $89,30\% \pm 0,63\%$ , у сорта Прывабны данный показатель оказался в два раза меньше –  $42,80\% \pm 1,55\%$ . По морфометрическим показателям у сорта Прывабны отмечены более высокие значения длины стебля и количества междоузлий. У сорта Камандор отмечено высокое значение длины корней (см. таблицу).

**Морфологические показатели развития растений-регенерантов сортов актинидии на первом этапе адаптации *ex vitro* – на субстрате торф + агроперлит (3 : 1)**

Показатель		Сорт	
		Прывабны	Камандор
Доля адаптированных растений, %		$42,8 \pm 1,55$	$89,3 \pm 0,63$
Средняя длина стебля, см	при посадке	$4,51 \pm 1,06$	$3,29 \pm 0,74$
	через 55 дней	$9,93 \pm 2,84$	$6,78 \pm 1,09$
Средняя длина корней, см	при посадке	$1,81 \pm 0,39$	$2,39 \pm 0,61$
	через 55 дней	$6,22 \pm 2,33$	$7,00 \pm 1,13$
Количество междоузлий, шт.	при посадке	$6,35 \pm 1,36$	$5,93 \pm 1,40$
	через 55 дней	$14,67 \pm 2,14$	$12,38 \pm 2,31$

Результаты однофакторного дисперсионного анализа были сходными с данными, полученными перед высадкой на адаптацию: сортовые особенности оказывали достоверное влияние на длину побега и количество междоузлий у растений ( $p < 0,05$ ) и не оказывали влияние на длину корней ( $p > 0,05$ ).

После адаптации в течение 55 дней увеличились морфологические показатели адаптированных растений. Средняя длина стебля у прижившихся растений увеличилась на  $(5,42 \pm 2,26)$  см



Рис. 3. Растения актинидии сорта Прывабны на первом этапе адаптации

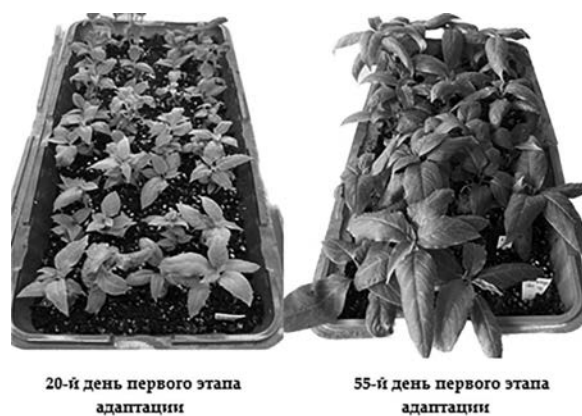


Рис. 4. Растения актинидии сорта Камандор на первом этапе адаптации

у сорта Прывабны и на  $(3,49 \pm 0,91)$  см у сорта Камандор, с увеличением длины стебля увеличилось количество междоузлий на  $(8,32 \pm 1,90)$  и  $(6,45 \pm 2,46)$  шт. соответственно. Среднее значение длины корней возросло на  $(4,41 \pm 2,28)$  см у сорта Прывабны и  $(4,61 \pm 1,20)$  см у сорта Камандор (рис. 3, 4).

При следующей пересадке к субстрату торф «Двина» + агроперлит (3 : 1) добавляли удобрение «Осмокот». Продолжение роста высаженных растений, а также рост новых побегов позволили завершить адаптацию на втором этапе (рис. 5).

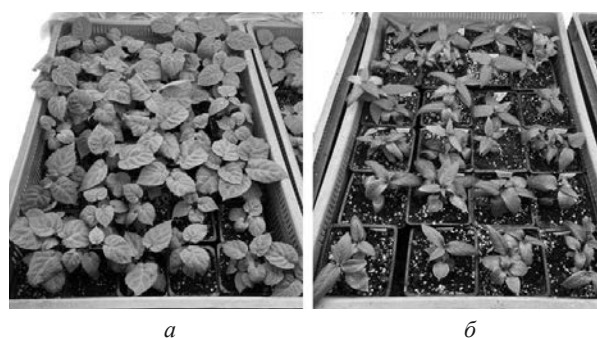


Рис. 5. Растения актинидии на втором этапе адаптации: а – Прывабны (*A. kolomikta*); б – Камандор (*A. arguta*)

## ВЫВОДЫ

При культивировании *in vitro* на среде MS с добавлением 0,5 мг/л 6-БА, глюкозы и сахарозы в соотношении 1 : 1 получены высокие показатели укореняемости растений мужских форм актинидии, доля которых составила  $(99,10 \pm 0,88)$  % для сорта Прывабны и  $(97,30 \pm 1,34)$  % для сорта Камандор.

Было обнаружено влияние генотипа на параметры микроразмножаемых побегов актинидии на данном этапе. Растения сорта Прывабны в культуре *in vitro* образовали меньше побегов и больше нарастали в длину, в то время как у растений сорта Камандор наблюдалась противоположная тенденция. Проведенный однофакторный дисперсионный анализ показал значимое влияние сортовых особенностей на длину побегов растений, а также на количество междоузлий, побегов и корней на этапе ризогенеза.

На первом этапе адаптации при использовании субстрата торф «Двина» с агроперлитом (3 : 1) было получено  $(89,30 \pm 0,63)$  и  $(42,80 \pm 1,55)$  % прижившихся растений сортов Камандор и Прывабны соответственно. У адаптированных растений отмечены хорошие показатели роста надземной и корневой частей. За период первого этапа адаптации более чем в три раза увеличилась длина корней сорта Прывабны (с  $(1,81 \pm 0,39)$  до  $(6,22 \pm 2,33)$  см) и почти в три раз у сорта Камандор

(с  $2,39 \pm 0,61$ ) до  $(7,00 \pm 1,13)$  см); более чем в два раза возрастала длина стебля у обоих сортов. На этапе адаптации сортовые особенности также оказывали достоверное влияние на длину побега и количество междоузлий у растений.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Малаева, Е. В. Сохранение редких и ценных видов растений методами биотехнологии / Е. В. Малаева // Грани познания. – 2021. – № 6 (77). – С. 58–61.
2. 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 плодоводства»; отв. за вып. В. В. Васеха. – Самохваловичи: [б. и.], 2020. – 30 с.
3. Матушкина, О. В. Особенности клонального микроразмножения ягодных культур / О. В. Матушкина, И. Н. Пронина // Пути интенсификации садоводства и селекция плодовых и ягодных культур: сб. ст. / Орл. зон. плодово-ягод. опыт. ст.; редкол.: Ю. В. Осипов (отв. ред.) [и др.]. – Тула, 1989. – С. 167–170.
4. Трунов, И. А. Оптимизация условий роста микрорастений садовых культур на этапе адаптации / И. А. Трунов, Ю. В. Хорошкова // Вестн. Мичур. гос. аграр. ун-та. – 2020. – № 1 (60). – С. 90–97.
5. Чевердин, А. Ю. Влияние микробных препаратов на урожайность ярового ячменя в условиях Центрального Черноземья / А. Ю. Чевердин // Вестн. Мичур. гос. аграр. ун-та. – 2019. – № 3 (58). – С. 81–84.
6. Батукаев, А. А. Адаптация растений винограда размноженных *in vitro* / А. А. Батукаев, М. С. Батукаев, Т. А. Дадаева // Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий: материалы докл. VII Съезда О-ва физиологов растений России и докл. на Междунар. науч. шк. «Инновации в биологии для развития биоиндустрии с-х. продукции», Н. Новгород, 4–10 июля 2011 г.: в 2 ч. / Рос. акад. наук [и др.]; редкол.: В. В. Кузнецов, А. П. Веселов, Г. А. Романов. – Н. Новгород, 2011. – Ч. 1. – С. 80–81.
7. Preece, J. E. The most tricky part of micropropagation: establishing plants in greenhouses and fields / J. E. Preece // Combined Proc., Intern. Plant Propagators' Soc. – 2002. – Vol. 51. – P. 300–303.
8. Особенности применения технологии клонального микроразмножения при производстве посадочного материала разных видов ягодных и декоративных культур / С. А. Муратова [и др.] // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки: сб. материалов III Междунар. науч. конф., Ялта, 24–28 сент. 2018 г. / Науч.-исслед. ин-т сел. хоз-ва Крыма; редкол.: В. С. Паштецкий (науч. ред.) [и др.]. – Ялта, 2018. – С. 71–72.
9. Высоцкий, В. А. Особенности клонального микроразмножения актинидии / В. А. Высоцкий, Л. В. Бартенева // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений: сб. ст. / Акад. наук СССР, Ин-т физиологии растений им. К. А. Тимирязева; отв. ред. Р. Г. Бутенко. – М., 1991. – С. 213–216.
10. Технология адаптации актинидии острой (*Actinidia arguta* (Siebold & Zucc.) Planch. ex Miq.) «Великанша» к постасептическим условиям / В. А. Чохели [и др.] // Музей-заповедник: экология и культура: материалы VIII Междунар. науч.-практ. конф., ст-ца Вёшенская, 12–13 окт. 2022 г. / М-во культуры Рос. Федерации, Гос. музей-заповедник М. А. Шолохова. – Вёшенская, 2022. – С. 85–89.
11. 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.
12. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

### IN VITRO RHISOGENESIS AND EX VITRO ADAPTATION OF MALE FORMS OF ACTINIDIA (ACTINIDIA LINDL.)

M. D. MOROZOVA

#### Summary

The study was carried out in the Biotechnology Department of the RUE “Institute of Fruit Growing” in 2022. Male forms of *Actinidia* of the Pryvabny variety (*Actinidia kolomikta*) and the Kamandor variety (*A. arguta*) have been chosen as the objects of the research. The effectiveness of *in vitro* rooting, the morphometric parameters of plants after *in vitro* rhisogenesis and at the *ex vitro* adaptation stage, as well as the effectiveness of the first stage of adaptation (the percentage of adapted plants) were evaluated. The analysis of the influence of varietal characteristics on the morphometric parameters of plants was carried out. Micropropagation on medium with 0.5 mg/l 6-BA, 15.0 g/l glucose, and 15.0 g/l sucrose made it possible to obtain well-developed explants with high rates of *in vitro* rhisogenesis (97.3–99.1 %), ready to planting at the stage of adaptation. The Kamandor variety received twice as many adapted plants (89.30 %  $\pm$  0.63 %) than the Pryvabny variety (42.80 %  $\pm$  1.55 %) at the stage of adaptation on the Dvina peat substrate with agropelrite (3 : 1).

**Keywords:** *Actinidia* Lindl., actinidia, male forms, *in vitro* culture, growth medium, substrate, *in vitro* rhisogenesis, *ex vitro* adaptation, Belarus.

Поступила в редакцию 17.03.2023