

СОЗДАНИЕ И ПОДДЕРЖАНИЕ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВ АКТИНИДИИ (*ACTINIDIA LINDL.*)

М. Д. МОРОЗОВА, Н. В. КУХАРЧИК

РУП «Институт плодоводства»,
ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: moromarie1999@gmail.com

АННОТАЦИЯ

Изучение литературных источников, характеризующих морфологические особенности актинидии, позволило предположить, что для эффективного сохранения растений в культуре *in vitro* в приоритете пересадка на новый пассаж узловых сегментов с 2–3 пазушными почками. Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2024–2025 гг. Объектами исследования были выбраны мужские и женские формы актинидии двух видов: сорта *A. kolomikta* – Прывабны (мужская форма), Сентябрьская, Превосходная (женская форма), *A. arguta* – Камандор (мужская форма), Киевская крупноплодная (женская форма). Оценивали эффективность пролиферации в культуре *in vitro* по следующим показателям: коэффициент размножения с одной пробирки; количество побегов в одной пробирке; коэффициент размножения с одного побега; доля укоренившихся растений. Проведен анализ влияния типа экспланта, видовых, половых и сортовых особенностей на исследуемые показатели. Лучшая эффективность пролиферации получена с использованием узловых сегментов при пассажировании. Для сохранения коллекции и поддержания пролиферирующей и ризогенной способности растений-регенерантов более подходящими эксплантами являются узловые сегменты побега с 2–3 пазушными почками.

Ключевые слова: *Actinidia Lindl.*, актинидия, культура *in vitro*, коллекция *in vitro*, питательная среда, тип экспланта, коэффициент размножения, пролиферация, ризогенез *in vitro*, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все больше внимания уделяется малораспространенным плодовым и ягодным культурам. Использование биотехнологических методов позволяет ускоренно размножать такие культуры, а также способствует сохранению уникальных сортов [1] и дает возможность 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 при размножении перспективных сортов [2].

Одним из важнейших биотехнологических приемов является создание и сохранение коллекции видов и сортов в культуре *in vitro*. Существует несколько способов создания и поддержания коллекции: путем пересадок на свежую питательную среду через определенный период культивирования (пассажирование) при активной вегетации; длительное хранение пробирочных растений при низких положительных температурах (депонирование) [3].

Актинидия – это плодовая лиана, и микроразмножение данной культуры осуществляется в основном способом деления микропобегов на узловые сегменты с 2–3 почками, при этом получается большое количество эксплантов, представляющих узловые сегменты, и единичные экспланты с верхушечной почкой (верхушки побегов) (рис. 1).

Первоначально на протяжении пяти пассажей для поддержания коллекции актинидии *in vitro* на свежую питательную среду пересаживались только верхушки побегов. В результате таких пересадок было отмечено замедление роста растений-регенерантов, снижение коэффициента размножения и доля укоренившихся растений.

В исследованиях морфологических особенностей актинидии делается акцент на то, что для данной культуры характерно симподиальное ветвление, соответственно, все побеги в конечном итоге самоуничтожаются после определенного срока роста. Выделяют два типа побегов: детерминантные и индетерминантные [4], или конечные и неконечные [5], однако отличие в этих типах побегов заключается только во времени прекращения их роста [6].

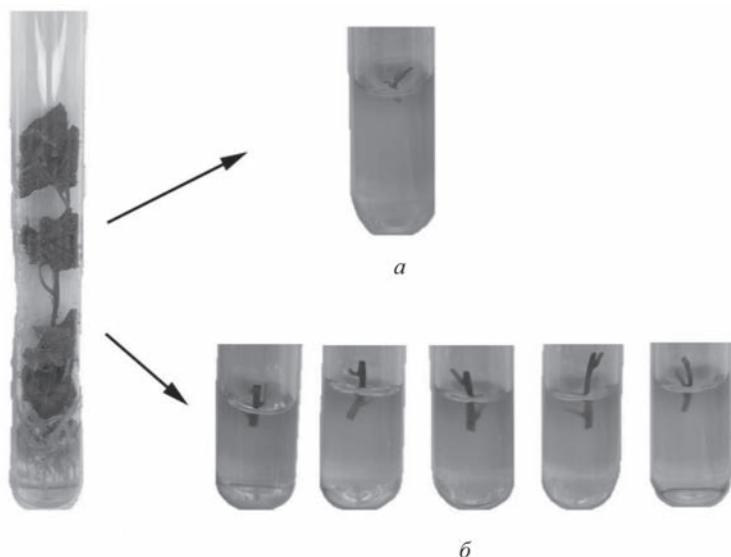


Рис. 1. Микроразмножение актинидии (на примере *A. kolomikta* сорта Прывабны): *а* – посаженная на свежую питательную среду верхушка побега (часть побега с верхушечной почкой); *б* – посаженные на свежую питательную среду узловые сегменты с 2–3 пазушными почками

В ботаническом обзоре вегетативных структур растения актинидии A. R. Ferguson [5] отметил, что молодые побеги при большинстве систем обрезки заменяются каждые 2–3 года. Кроме того, базальные почки лианы обычно не вырастают в побеги, если первичная (апикальная) точка роста не удалена или не повреждена.

В исследовании A. Seleznyova, G. Thorp, A. Barnett, E. Costes [6] был проведен количественный анализ развития побегов и моделей ветвления актинидии, в котором классифицировали типы побегов на короткие, средние и длинные в зависимости от способа распределения количества узлов. Для каждого типа побега были выделены две модели симподиального ветвления: акротоническое (с короткой зоной на верхушке, характеризующейся 100%-ным ветвлением) – на коротких и средних побегах и мезотоническое (с неразветвленной зоной у основания и короткими пазушными побегами на верхушке) – на длинных побегах. Авторы указали, что наибольшая плотность узлов характерна для основания побега и конечной части побега, а наибольшее расстояние между узлами – для срединной части побега. В результате проведенного количественного анализа установлено, что побеги второго порядка, вырастающие из пазушных почек конечной части побега, были короткими, а самые длинные вырастали из пазушных почек, расположенных в месте наибольшего расстояния междуузлий. Кроме того, авторами было отмечено, что увеличение образования длинных побегов в этом срединном участке может быть связано с характером развития родительского побега и переходом от предварительно сформированной к несформированной части родительского побега. Разработанный подход был рекомендован авторами для изучения влияния систем обрезки киви на развитие побегов, однако нами не исключается, что такой подход может использоваться также для изучения развития побегов при культивировании растений-регенерантов в культуре *in vitro*.

Вышеизложенное исследование получило продолжение, в котором E. M. Foster, A. N. Seleznyova, A. M. Barnett [7] были изучены органогенез апикальной меристемы побега во время роста побега и остановка развития верхушки побега. Модели приостановления развития верхушек побегов сравнивались в разных генотипах видов актинидии *A. arguta*, *A. polygama* и *A. indochinensis*. В результате исследования было выявлено, что органогенез и остановка развития верхушек побегов контролируются независимо, т. е. все почки растения имеют одинаковый потенциал развития для новообразования. Соответственно, все побеги имеют потенциал разиться в длинные побеги. У актинидии остановка развития верхушки побега может произойти в любой момент, что приводит к коротким или средним побегам. Однако, как только начинается

новообразование, рост становится в значительной степени неопределенным, в результате чего новые побеги длинные. Авторами был сделан вывод о том, что развитие побега киви – это результат трех процессов: инициация новых фитомеров апикальной меристемой, расширение фитомеров и остановка развития верхушки побега.

Изучение литературных источников касаемо морфологических особенностей актинидии позволило предположить, что для эффективного сохранения растений в культуре *in vitro*, включая поддержание коэффициента размножения и ризогенной способности растений на высоком уровне, необходимо удалять верхушку побега, пересаживая на новый пассаж узловые сегменты с 2–3 пазушными почками.

Цель исследования – выделить морфологические особенности видов (*A. kolomikta*, *A. arguta*) и сортов рода *Actinidia* Lindl. и подобрать оптимальный тип экспланта при создании и поддержании коллекций в культуре *in vitro* путем пассажирования при нормальной вегетации.

ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства». Объекты исследований: сорта *A. kolomikta* – Прывабны (мужская форма), Сентябрьская, Превосходная (женская форма), сорта *A. arguta* – Камандор (мужская форма), Киевская крупноплодная (женская форма).

Прывабны (*A. kolomikta*). Лиана высотой до 8 м. Листья цельные, яйцевидные. Листовая пластинка сверху темно-зеленая с редким опушением по жилкам, снизу – грязно-зеленая. Перед цветением характерна пестролистность (приобретение малиновой окраски листьями). Цветки блюдцевидные с 5 лепестками диаметром до 2 см. Устойчивый к грибным болезням и вредителям сорт [8].

Сентябрьская (*A. kolomikta*). Лиана до 18–20 м в высоту. Сорт созревает в сентябре, обладает морозоустойчивостью до -30°C , высокой урожайностью, самобесплодный, требует опылителя. Плоды эллиптические, гладкие, сочные. Обладает устойчивостью к болезням и вредителям [8].

Превосходная (*A. kolomikta*). Лиана высотой до 8 м, толщиной до 2 см у основания. Сорт зимостойкий, среднеурожайный (2,5 кг с куста). Самобесплодный, требует опылителя. Вступает в плодоношение на 3–4-й год после посадки. Плоды цилиндрической формы, темно-зеленые, средние по размеру (2,5 г). Поверхность ребристая. Вкус кисловато-сладкий [8].

Камандор (*A. arguta*). Лиана до 20 м в высоту. Окраска коры светло-серая. Листья широковальной или яйцевидной формы с заостренной верхушкой. Пластина листа плотная, блестящая, темно-зеленая сверху и светло-зеленая с нижней стороны, с черешками длиной около 7 см. Цветки чашевидной формы с 5 лепестками диаметром 2–3 см. Сорт средней зимостойкости, устойчив к заболеваниям [8].

Киевская крупноплодная (*A. arguta*). Лиана высотой до 20 м. Побеги серые с белыми точками. Листья крупные, эллиптической формы. Цветки белые, одиночные. Плоды созревают в начале сентября, крупные, массой 10–20 г. Устойчив к болезням и вредителям [8].

Экспланты культивировали на модифицированной питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга [9] (MS) с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиладенина (6-БА), 0,5 мг/л тиамина гидрохlorida (B₁), 0,5 мг/л пиридоксина гидрохlorida (B₆), 0,5 мг/л никотиновой кислоты (РР), 1,0 мг/л аскорбиновой кислоты (С), 15 г/л глюкозы, 15 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 составляла $+21\dots+23^{\circ}\text{C}$, фотопериод – 16/8 ч. Длительность субкультивирования (одного пассажа) – 60 дней.

На питательную среду высаживали два типа эксплантов: часть побега с верхушечной почкой (верхушки побегов) и узловые сегменты с 2–3 почками.

Оценивали эффективность пролиферации в культуре *in vitro* по следующим показателям: коэффициент размножения с одной пробирки; количество побегов в одной пробирке, шт.; коэффициент размножения с одного побега; доля укоренившихся растений, %.

Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTICA 6.0, используя ANOVA, однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ, критерий Дункана ($p < 0,05$). Построение графиков проводили в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении разных типов эксплантов сортов актинидии *in vitro* отмечено, что при посадке узловых сегментов у выросших растений-регенерантов были достигнуты более высокие показатели коэффициентов размножения с одной пробирки, коэффициентов размножения с одного побега и отмечено большее количество побегов в одной пробирке (рис. 2, 3). Такие показатели свидетельствуют о высокой степени пролиферации растений-регенерантов при использовании узловых сегментов в качестве экспланта.

Кроме того, для актинидии характерно спонтанное укоренение растений-регенерантов на среде для размножения (среда с цитокинином, без ауксинов). Такое явление было отмечено нами в предыдущем исследовании при использовании такого же состава питательной среды [10] и коррелирует с исследованиями других авторов [11]. В случае с высадкой разных типов эксплантов было отмечено, что после посадки верхушек побегов доля укоренившихся эксплантов по прошествии периода субкультивирования была меньше, чем после посадки узловых сегментов (рис. 2, 3). Это свидетельствует о более высокой ризогенной способности растений при использовании узловых сегментов в качестве экспланта.

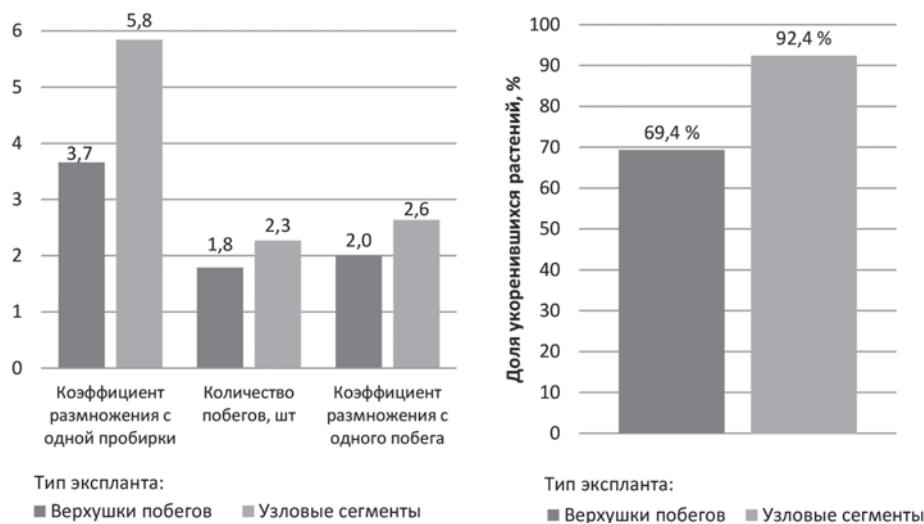


Рис. 2. Основные показатели развития растений-регенерантов в культуре *in vitro* после субкультивирования разных типов эксплантов (приведены средние значения по всем сортам для каждого типа экспланта)

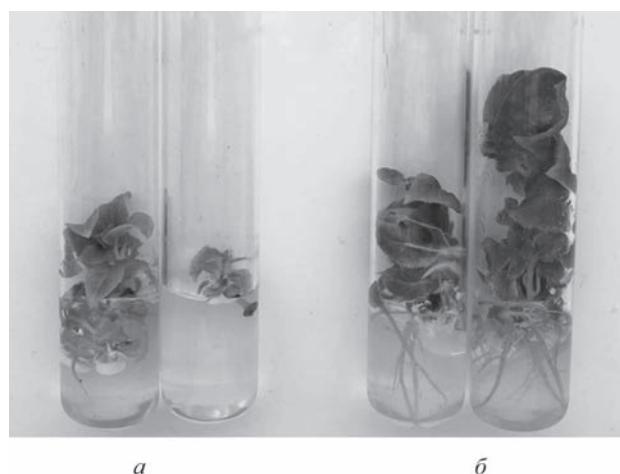


Рис. 3. Растения *A. arguta* сорта Киевская крупноплодная после субкультивирования разных типов эксплантов в течение 60 дней: *a* – посаженные верхушки побегов (часть побега с верхушечной почкой); *б* – посаженные узловые сегменты с 2–3 пазушными почками

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ показал значимое влияние типа экспланта на коэффициент размножения с одной пробирки, количество побегов в одной пробирке, коэффициент размножения с одного побега, долю укоренившихся растений ($p < 0,05$).

Было выявлено влияние генотипа на коэффициент размножения растений с одной пробирки, количество побегов в одной пробирке, коэффициент размножения с одного побега, долю укоренившихся растений. Помимо ранее отмеченного значимого влияния типа экспланта на эти показатели, с использованием однофакторного дисперсионного анализа также была выявлена статистически значимая разница в **коэффициенте размножения с одной пробирки** у растений разных видов (между *A. kolomikta* и *A. arguta*) и у растений разного пола. Наибольшие значения коэффициента размножения с одной пробирки были отмечены у растений *A. arguta* – 5,6 (у *A. kolomikta* – 4,2) и у растений мужской формы – 6,5 (у женской формы – 4,2). Статистически значимая разница в коэффициенте размножения из одной пробирки, согласно однофакторному дисперсионному анализу, была выявлена между сортами Превосходная, Сентябрьская, Киевская крупноплодная и сортами Камандор, Прывабны. Наибольшие коэффициенты размножения были отмечены при посадке узловых сегментов у сортов Прывабны и Камандор (7,5 и 7,9 соответственно). Двухфакторный дисперсионный анализ подтвердил влияние сорта и типа экспланта на коэффициент размножения с одной пробирки, однако совместного влияния этих факторов выявлено не было. На рис. 4 результаты двухфакторного статистического анализа отражены более подробно.

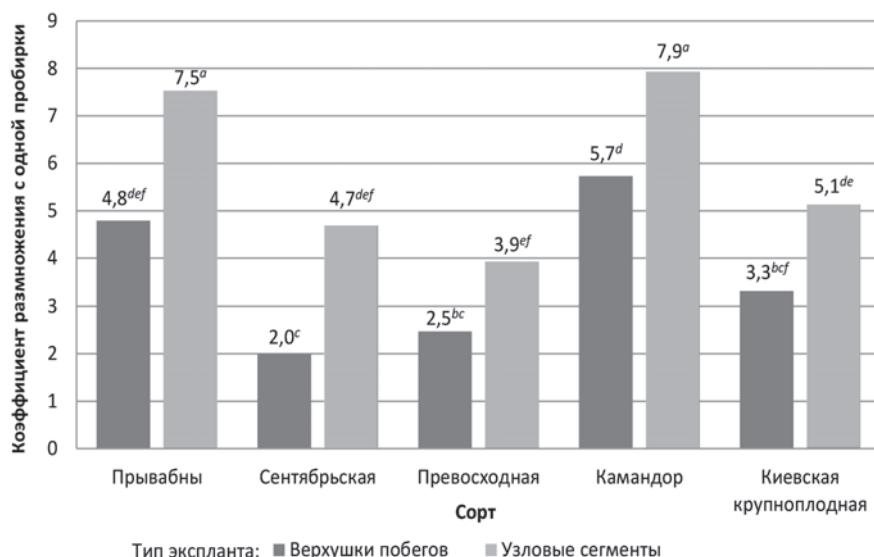


Рис. 4. Влияние типа экспланта и сорта на коэффициент размножения с одной пробирки растений-регенерантов актинидии

П р и м е ч а н и е. Данные с одинаковыми буквами статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана).

По показателю **количества побегов в одной пробирке** с помощью однофакторного дисперсионного анализа была выявлена статистически значимая разница у растений разных видов (1,8 шт. у *A. kolomikta* и 2,4 шт. у *A. arguta*) и отсутствие значимой разницы между растениями разного пола (2,2 шт. у мужской формы и 1,9 – у женской). Для сортов статистическая значимая разница была выявлена между сортом Превосходная и всеми остальными исследуемыми сортами (у сорта Превосходная в среднем для обоих типов эксплантов отмечено наименьшее количество побегов – 1,4 шт.); между сортами Сентябрьская и Киевская крупноплодная; между сортами Прывабны и Киевская крупноплодная. Наибольшее значение количества побегов в одной пробирке было получено при использовании узловых сегментов у сорта Киевская крупноплодная (3,1 шт.). С помощью двухфакторного дисперсионного анализа также было подтверждено влияние сортовых особенностей и типа экспланта на количество побегов в одной пробирке (рис. 5), однако совместного влияния этих факторов выявлено не было.

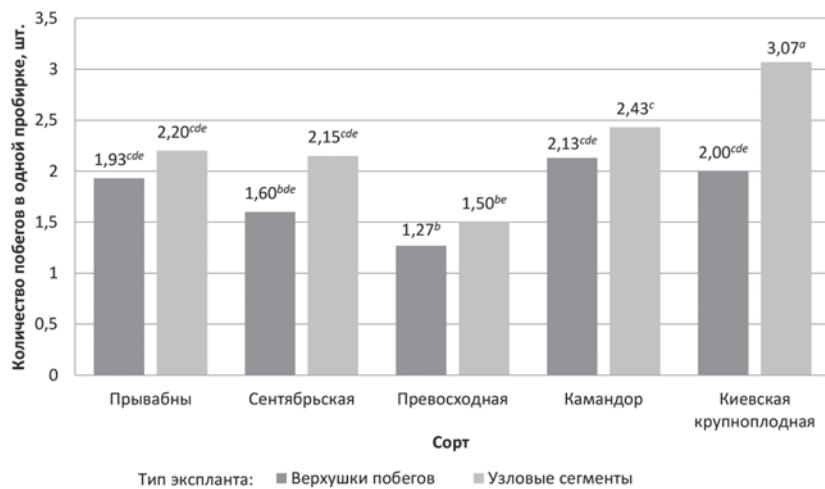


Рис. 5. Влияние типа экспланта и сорта на количество побегов в одной пробирке растений-регенерантов актинидии
П р и м е ч а н и е. Данные с одинаковыми буквами статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана).

Статистически значимая разница выявлена в **коэффициенте размножения с одного побега** между растениями разного пола (3,0 у растений мужской формы и 1,7 у растений женской формы). Между растениями разных видов статистически значимой разницы по этому показателю не было обнаружено (2,4 у растений *A. kolomikta* и 2,3 у растений *A. arguta*). Для сортов статистически значимая разница была выявлена у сорта Превосходная и всех остальных исследуемых; у сортов Сентябрьская, Киевская крупноплодная (в среднем для обоих типов эксплантов отмечены наименьшие значения коэффициента размножения с одного побега – 1,7 и 1,8 соответственно) по сравнению со всеми остальными исследуемыми сортами; у сортов Прывабны, Камандор (в среднем для обоих типов эксплантов отмечены наибольшие коэффициенты размножения с одного побега – 3,0) по сравнению со всеми остальными исследуемыми сортами. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа были аналогичны полученным по предыдущим исследуемым показателям: сортовые особенности и тип экспланта оказывали значимое влияние на коэффициент размножения с одной пробирки (рис. 6), при этом совместного влияния этих факторов выявлено не было.



Рис. 6. Влияние типа экспланта и сорта на коэффициент размножения с одного побега растения-регенеранта актинидии
П р и м е ч а н и е. Данные с одинаковыми буквами статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана).

Ризогенная способность эксплантов также отличалась у растений разных видов, форм и сортов. Однофакторный дисперсионный анализ позволил выявить статистически значимое

влияние фактора пола на долю укорененных растений-регенерантов (78,5 % у мужской формы и 90,0 % у женской формы), при этом влияния фактора вида обнаружено не было (82,2 % у *A. kolomikta* и 82,0 % у *A. arguta*). Статистически значимая разница в доле укорененных растений была выявлена между сортами Киевская крупноплодная (наименьший показатель укореняемости в среднем для обоих типов эксплантов – 70,7 %) и Камандор (наибольший показатель укореняемости в среднем для обоих типов эксплантов – 93,3 %), а между остальными сортами статистически значимой разницы выявлено не было. Наибольшая доля укорененных растений была у сортов Прывабны и Камандор при посадке узловых сегментов – 100 %.

Двухфакторный дисперсионный анализ позволил выявить значимое влияние сортовых особенностей и типа экспланта на долю укорененных растений (рис. 7), при этом совместного влияния этих факторов выявлено не было.

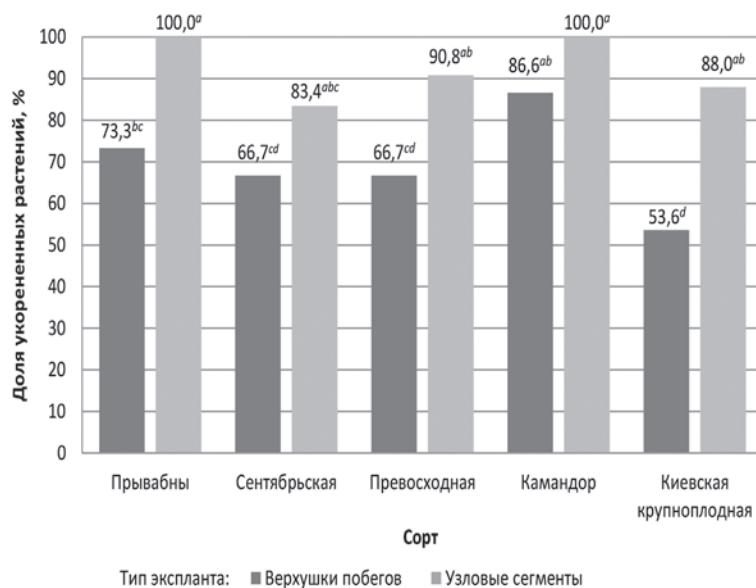


Рис. 7. Влияние типа экспланта и сорта на долю укорененных растений-регенерантов актинидии.

Примечание. Данные с одинаковыми буквами статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана).

ВЫВОДЫ

При поддержании *in vitro* коллекции видов актинидии разных сортов и форм путем пересадок каждые 60 дней на среде MS с добавлением 0,5 мг/л 6-БА, 15 г/л глюкозы и 15 г/л сахарозы наибольшие показатели коэффициента размножения с одной пробирки, количества побегов в одной пробирке, коэффициента размножения с одного побега и укореняемости получены при использовании узловых сегментов в качестве экспланта. Статистический анализ подтвердил достоверное влияние типа экспланта на вышеперечисленные показатели для всех сортов и форм актинидии.

Установлено влияние генотипа на параметры микроразмножения побегов актинидии при поддержании коллекции *in vitro*. Отмечено достоверное влияние сорта на все исследуемые показатели вне зависимости от типа экспланта. При этом видовая принадлежность оказывала достоверное влияние только на коэффициент размножения с одной пробирки и количество побегов в одной пробирке, а пол растений – на коэффициент размножения с одной пробирки, коэффициент размножения с одного побега и долю укорененных растений.

По результатам исследования можно заключить, что для ускоренного размножения и получения большого количества посадочного материала подходит использование всех типов эксплантов, в то время как для сохранения коллекции и поддержания пролиферирующей и ризогенной способности растений-регенерантов более подходящими эксплантами являются узловые сегменты побега с 2–3 пазушными почками.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Крахмалева, И. Л. Перспективные сорта *Actinidia polygama* (Sieb. et Zucc.) Maxim. и особенности их культивирования *in vitro* / И. Л. Крахмалева, О. И. Молканова, И. В. Митрофанова // Наследие академика Н. В. Цицина: ботанические сады. Отдаленная гибридизация растений и животных : материалы Всерос. науч. конф. с междунар. участием, посвящ. 125-летию акад. Н. В. Цицина, М., 3–7 июля 2023 г. / М-во науки и высш. образования Рос. Федерации, Гл. ботан. сад им. Н. В. Цицина Рос. акад. наук, Совет ботан. садов России [и др.] ; под ред. С. А. Сенатора, В. П. Упелниека. – М., 2023. – С. 17–19.
2. Малаева, Е. В. Сохранение редких и ценных видов растений методами биотехнологии / Е. В. Малаева // Границы познания. – 2021. – № 6 (77). – С. 58–61.
3. Размножение плодовых, ягодных растений, винограда и хмеля в культуре *in vitro* / Н. В. Кухарчик, М. С. Кастроцкая, Е. В. Колбанова [и др.] ; под общ. ред. Н. В. Кухарчик. – Минск : Колорград, 2021. – 400 с.
4. Brundell, D. J. Flower development of the Chinese Gooseberry (*Actinidia chinensis* Planch.) I. Development of the flowering shoot / D. J. Brundell // New Zealand Journal of Botany. – 1975. – Vol. 13. – P. 473–483.
5. Ferguson, A. R. Kiwifruit: a botanical review / A. R. Ferguson // Horticultural Reviews. – 1984. – Vol. 6. – P. 1–64.
6. Quantitative analysis of shoot development and branching patterns in *Actinidia* / A. Seleznjova, G. Thorp, A. Barnett, E. Costes // Annals of botany. – 2002. – Vol. 89. – P. 471–482.
7. Foster, T. M. Independent control of organogenesis and shoot tip abortion are key factors to developmental plasticity in Kiwifruit (*Actinidia*) / T. M. Foster, A. N. Seleznjova, A. M. Barnett // Annals of botany. – 2007. – Vol. 100. – P. 471–481.
8. Генофонд плодовых и ягодных растений Беларусь: атлас сортов плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда / З. А. Козловская, А. А. Таранов, Л. В. Фролова [и др.] ; под общ. ред. З. А. Козловской, А. А. Таранова ; НАН Беларусь, Ин-т плодоводства. – Минск : Беларус. наука, 2020. – 542 с.
9. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15, iss 3. – P. 473–497.
10. Морозова, М. Д. Ризогенез *in vitro* и адаптация *ex vitro* мужских форм актинидии (*Actinidia Lindl.*) / М. Д. Морозова // Плодоводство : сб. науч. тр. / НАН Беларусь, Ин-т плодоводства ; редкол.: А. А. Таранов (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2023. – Т. 35. – С. 100–105.
11. Высоцкий, В. А. Особенности клonalного микроразмножения актинидии / В. А. Высоцкий, Л. В. Бартенева // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений : сб. ст. / АН СССР, Ин-т физиологии растений им. К. А. Тимирязева ; отв. ред. Р. Г. Бутенко. – М., 1991. – С. 213–216.

ESTABLISHMENT AND MAINTENANCE OF AN IN VITRO COLLECTION OF ACTINIDIA (ACTINIDIA LINDL.) CULTIVARS

M. D. MOROZOVA, N. V. KUKHARCHIK

Abstract

A review of the literature on the morphological characteristics of *Actinidia* suggested that, for effective preservation of plants in *in vitro* culture, subculturing nodal segments with 2–3 axillary buds should be prioritized. The study was conducted at the Biotechnology Department of the Republican Unitary Enterprise Institute of Fruit Growing during 2024–2025. The objects of study were male and female forms of two *Actinidia* species: *A. kolomikta* – Pryvabny (male), Sentyabrskaya, and Prevoshodnaya (female); *A. arguta* – Kamandor (male), and Kievskaya Krupnoplodnaya (female). The effectiveness of proliferation in *in vitro* culture was assessed by the following parameters: multiplication rate per test tube, number of shoots per test tube, multiplication rate per shoot, and percentage of rooted plants. The influence of explant type, species, sex, and cultivar-specific traits on the studied parameters was analyzed. The best proliferation efficiency was achieved using nodal segments during subculturing. Nodal segments with 2–3 axillary buds were found to be the most suitable explants for maintaining the collection and preserving the proliferative and rhizogenic potential of regenerant plants.

Keywords: *Actinidia Lindl.*, *Actinidia*, *in vitro* culture, *in vitro* collection, culture medium, explant type, multiplication rate, proliferation, *in vitro* rhizogenesis, Belarus.

Поступила в редакцию 21.02.2025