Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

УДК 634.74:57.085.23

Особенности депонирования некоторых сортов *Lonicera caerulea* L. в культуре *in vitro*

Орлова Н.Д., Раева-Богословская Е.Н., Молканова О.И., Мирошниченко А.С., Гусева М.В.

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН

Аннотация

В статье приведены результаты исследований по изучению влияния ретардантов на депонирование сортов L. caerulea в условиях замедленного роста в культуре in vitro. Объекты исследования - сорта жимолости: Галочка, Камчадалка, Люлия, Московская 23. Установлено влияние генотипа и типа ретарданта на жизнеспособность эксплантов. Отмечено, что наибольшей жизнеспособностью при депонировании характеризовались микропобеги сорта Московская 23. Определены оптимальные сроки, тип и концентрация ретарданта для сохранения жимолости in vitro *при температуре* +10°С.

Ключевые слова: *LONICERA CAERULEA* L., *IN VITRO,* ДЕПОНИРОВАНИЕ, РЕТАРДАНТ

Введение

Род Жимолость (*Lonicera* L.) относится к семейству Caprifoliaceae и включает около 200 видов, распространенных преимущественно в северном полушарии в районах умеренного климата. *Lonicera caerulea* L. представляет собой листопадный кустарник высотой до 2,5 м со съедобными синими плодами [1].

Ареал произрастания жимолости простирается от Дальнего Востока до Средней Азии. Кустарник встречается в низовьях рек, на опушках хвойных лесов, на равнинах и в горной местности [2]. Растение характеризуется неприхотливостью, а также является одной из скороплодных и ранних ягодных культур. Период плодоношения может наступать на второй год после посадки и длиться более 30 лет [3-5].

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

L. caerulea является одной из самых раннеплодоносящих и высоковитаминных ягодных культур в условиях умеренного климата [6, 7]. В плодах этой культуры содержится большое количество биологически активных веществ, макро- и микроэлементов. Процентное содержание на сырую массу ягод жимолости составляет до 14,7 % сухих веществ, до 5,2 % сахаров и до 1,45 % пектиновых веществ. В биохимический состав плодов *L. caerulea* входят: витамин С, витамин Р, провитамин А, витамин В1, В2, В9 [8]. Помимо витаминов плоды содержат макро- и микроэлементы: магний, натрий, калий, марганец, медь, кремний, йод, алюминий, стронций и барий [9, 10].

Плоды жимолости характеризуется капилляроукрепляющим, гепато- и кардиопротекторным и антиоксидантным действием [11].

В ГБС РАН сформирован один из крупнейших в России генетический банк *in vitro* представителей *L. caerulea*, насчитывающий 32 перспективных и хозяйственно ценных генотипа, из ведущих селекционных центров, в том числе ГБС РАН. Некоторые новые сорта *L. caerulea*, полученные из других научно-исследовательских институтов, находятся в открытом грунте и представлены единичными экземплярами. Культивирование L. *caerulea in vitro* даёт возможность получить большое количество генетически однородного, корнесобственного посадочного материала за короткий срок.

Клональное микроразмножение в условиях нормального роста влечет за собой дополнительные затраты [12]. Так, например накопление цитокининов в растительном материале вследствие частых пересадок способствует снижению регенерационного потенциала и в ряде случаев вызывает сомаклональную изменчивость [13]. Депонирование эксплантов в условиях *in vitro* позволяет увеличить интервалы субкультивирования от полугода до нескольких лет [14, 15]. Поэтому актуальным является совершенствование существующих методов хранения растений в условиях замедленного роста в культуре *in vitro*.

Депонирование растений *in vitro* заключается в достижении замедленного метаболизма, способствующего сохранению жизнеспособности экспланта. Существуют различные способы длительного хранения тканей и органов растений: криогенное хранение (-196°С), хранение при температурах, близких к нулю (4°С), хранение при нормальных температурных условиях (20-26°С) [16]. Для многих культур оптимальной

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

температурой для длительного хранения растений *in vitro* является +4°С [17]. На снижение процессов метаболизма влияет добавление в состав питательной среды осмотических компонентов или ингибиторов роста, понижение освещенности и некоторые другие факторы [18, 19].

Для каждого вида и сорта растения существуют специфические требования к условиям депонирования [13]. Правильный выбор типа эксплантa, регуляторов роста, минеральной основы и других компонентов питательной среды при культивировании *in vitro* позволяет сохранить ценные генотипы при минимальных затратах [20-22].

И.В. Митрофановой и др. [23] представлены результаты работ по сохранению некоторых декоративных, ароматических и плодовых культур. Показано, что депонирование эксплантов инжира и хурмы восточной *in vitro* на среде ¼ MS с добавлением 0,2 г/л хлорхолинхлорида (ССС) и 60 г/л сахарозы, при температуре 8-10°С обеспечивало сохранение жизнеспособности на протяжении 12 месяцев беспересадочного культивирования.

Большинство исследований посвящено оптимизации основных этапов клонального микроразмножения *L. caerulea* [24-27]. Публикаций, касающихся депонирования эксплантов *L. caerulea in vitro,* крайне мало. Так, И.А. Бъядовский выявил, что наиболее эффективным вариантом депонирования жимолости в культуре *in vitro* являлось культивирование микрорастений на питательной среде с добавлением жасмоновой кислоты в концентрации 0,5 и 1,0 мг/л при низких положительных температурах (+3...+6°С) [28].

Целью данной работы является изучение влияния ретардантов на жизнеспособность эксплантов сортов *L. caerulea* при депонировании.

Материалы и методы

Исследования проводили в Лаборатории биотехнологии растений Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина Российской академии наук (ГБС РАН) в 2020-2021 годах.

Объектами исследования были следующие сорта жимолости: Галочка, Камчадалка, Люлия, Московская 23. Методы исследования основывались на общепринятых классических [29] и разработанных в Лаборатории биотехнологии растений ГБС РАН [30]

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

методах работы с культурами изолированных тканей и органов растений. Опыт проводили в 10-кратной повторности.

Для депонирования микропобегов в состоянии замедленного роста применяли питательную среду ½MS [31] с добавлением сахарозы в концентрации 40 г/л, 6-BAP (6-бензиламинпурин) в концентрации 0,1 мг/л, ретардантов хлорхолинхлорид (ССС) в концентрации 0,4 г/л и препарата «ТУР» (действующее вещество хлорхолинхлорид) в концентрации 7,5 мл/л. В качестве контроля была использована питательная среда без добавления ретарданта. Депонирование микропобегов проводили в климокамере (+10ºС, фотопериод 8/16 ч.). Через 10 месяцев учитывали количество жизнеспособных эксплантов (%), а также определяли морфометрические показатели: число и длину побегов, число узлов на побеге, число зелёных листьев, число корней.

В ходе изучения регенерационного потенциала сортов жимолости после длительного депонирования производили пересадку эксплантов в условия для размножения. Микропобеги культивировали при освещенности 1,5...2,0 Кл, 16-часовом фотопериоде и температуре 25±2°С. В качестве контроля были использованы растения-регенеранты, культивируемые в нормальных условиях в течение 10 месяцев. Через 28 суток с момента высадки эксплантов учитывали морфометрические показатели и на их основе рассчитывали коэффициент размножения (КР).

Обработку полученных данных проводили по общепринятым методам статистического анализа ANOVA [32] с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Использование ретардантов в составе питательной среды способствует снижению скорости роста (регенерации) микропобегов при депонировании. Однако на жизнеспособность эксплантов также влияет и генотип растения.

В результате исследования установлено существенное различие между веществами, содержащими хлорхолинхлорид. Действие ССС (жизнеспособность эксплантов составила 31,4%) существенно выше в сравнении с препаратом «ТУР» (жизнеспособность 11,1%), но не различается с контрольным вариантом (жизнеспособность 37,8%) (табл. 1).

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

Таблица 1. Влияние типа ретарданта на жизнеспособность микропобегов при длительном депонировании сортов *L. caerulea* при +10 °С, %

Сорта	Количество жизнеспособных регенерантов, %			
	Тип ретарданта		Контроль	$\overline{x_a}^*$
	ССС	ТУР		
Галочка	34,9	0,6	47,8	27,7
Камчадалка	16,2	8,3	20,8	15,1
Люлия	23,9	11,3	49,9	28,4
Московская 23	50,8	24,4	32,9	36,0
$\overline{x_b}^{**}$	31,4	11,1	37,8	

Примечания: * $НСР_{05}$ для фактора a (генотип) 24,7%; ** $НСР_{05}$ для фактора b (тип ретарданта) 19,2%.

В ходе статистического анализа установлено влияние генотипа на сохранение эксплантов в условиях депонирования. Процент жизнеспособных микропобегов у сорта Московская 23 (36,0%) существенно выше, чем у сорта Камчадалка (15,1%). Между другими исследуемыми сортами значительных различий по проценту жизнеспособности не обнаружено.

Стоит отметить, что сорта Галочка и Люлия характеризовались наибольшими процентами жизнеспособных регенерантов на контрольном варианте опыта (47,8% и 49,9% соответственно). В то же время микропобеги сорта Московская 23 лучше сохранились на питательной среде с добавлением хлорхолинхлорида (ССС) в концентрации 4 мг/л (50,8%).

У большинства исследуемых сортов на питательной среде с добавлением ретарданта «ТУР» наблюдали интенсивное выделение продуктов окисления полифенолов, а также образование каллуса на базальной части микропобега, что приводило к дальнейшей гибели экспланта (рис. 1).

Так как на питательной среде с добавлением ретарданта «ТУР» наблюдали наименьший процент жизнеспособных регенерантов у всех исследуемых сортов, данный вариант опыта в дальнейшем анализе морфометрических показателей не учитывали.

В ходе статистической обработки данных было выявлено, что наибольшее количество образовавшихся микропобегов у сортов жимолости отмечено на контрольном варианте питательной среды (табл. 2).

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

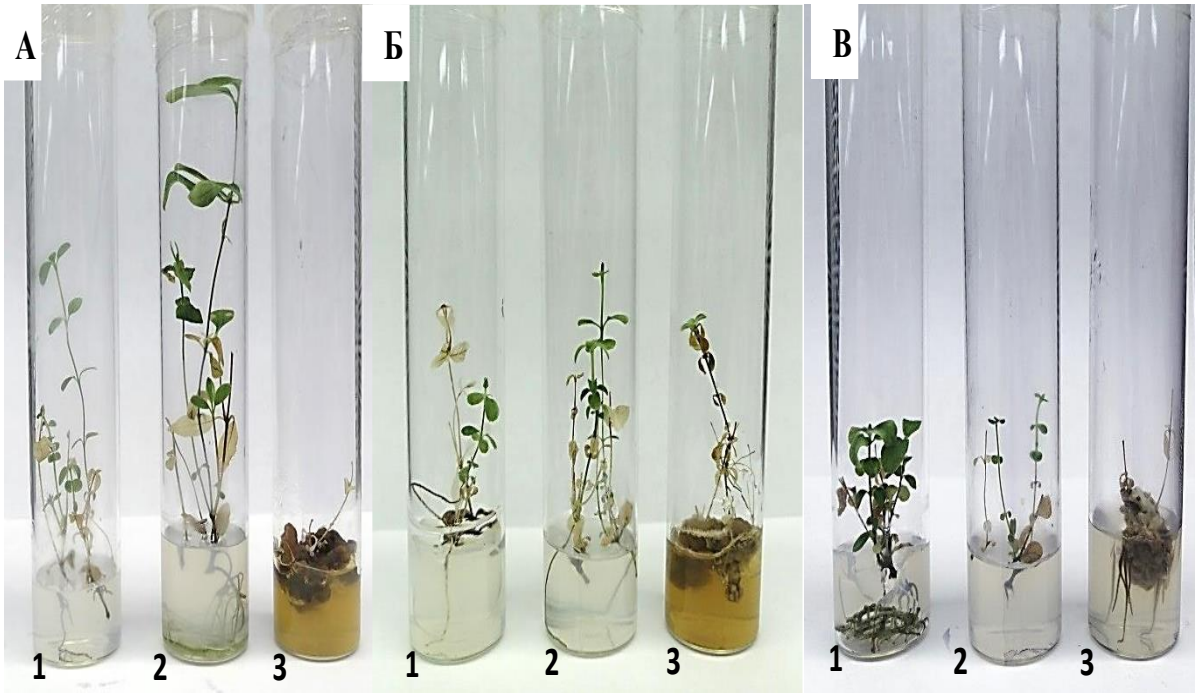

Рис. 1. Экспланты сортов *L. caerulea*
Примечания: А – Галочка, Б – Камчадалка, Г – Люлия (после 10 месяцев депонирования на различных питательных средах: 1 – контроль, 2 – ССС, 3 – «ТУР»).

Таблица 2. Морфометрические показатели эксплантов *L. caerulea* после 10 месяцев депонирования (размер исходного экспланта 1,5 см)

Сорт	Тип ретарданта	Длина микропобега, см	Количество микропобегов, шт.	Количество узлов/эксплант, шт.	Количество листьев/ эксплант, шт.
Галочка	1*	7,2 ± 1,8	2,7 ± 1,0	9,0 ± 1,5	14,5 ± 3,5
	2*	5,4 ± 2,1	3,7 ± 0,5	9,7 ± 4,5	12,3 ± 2,5
Камчадалка	1	3,7 ± 1,6	1,2 ± 0,5	8,0 ± 1,0	13,4 ± 1,5
	2	4,7 ± 0,3	1,7 ± 0,5	9,7 ± 2,0	18,0 ± 0,5
Люлия	1	3,6 ± 0,6	1,3 ±0,5	8,3 ± 1,0	14,7 ± 0,5
	2	4,1 ± 1,1	2,1 ± 1,0	9,1 ± 2,0	15,3 ± 2,0
Московская 23	1	10,3 ± 2,2	3,2 ± 1,0	17,1 ±3,3	26,6 ± 3,0
	2	7,0 ± 0,3	7,0 ± 1,0	14,0 ± 1,0	30,5 ± 2,5

Примечания: 1* - Среда с добавлением ретарданта ССС; 2* - Контроль.

В свою очередь использование ретардантов при депонировании способствовало снижению ростовых процессов: наименьшим числом микропобегов характеризовались сорта Камчадалка (1,2±0,5 шт.) и Люлия (1,3±0,5 шт.) на питательной среде, содержащей ССС.

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»

Максимальную высоту микропобегов наблюдали у сортов Московская 23 (10,3±2,2 см) и Галочка (7,2±1,8 см), а минимальную – у сортов Камчадалка (3,7±1,6 см) и Люлия (3,6±0,6 см) на питательной среде с добавлением ретарданта ССС. На контрольном варианте наибольшей высотой характеризовались сорта Галочка (5,4±2,1 см) и Московская 23 (7,0±0,3 см), наименьшей – Камчадалка (4,7±0,3 см) и Люлия (4,1±1,1 см). Число узлов и число листьев на микропобеге у сорта Московская 23 превышали данные показатели у других сортов, участвовавших в опыте. Также в ходе опыта отмечали спонтанное корнеобразование у всех сортов.

Сохранение регенерационного потенциала культуры после депонирования важно для последующих этапов клонального микроразмножения. Высота эксплантов жимолости, высаженных после депонирования на питательную среду для размножения, в большинстве вариантов опыта находились на уровне микропобегов, культивируемых в течение 10 месяцев при нормальных условиях. Стоит отметить, что у сорта Люлия коэффициент размножения после депонирования превышал показатель на контрольном варианте опыта. (табл. 3).

Таблица 3. Морфометрические показатели эксплантов сортов *L. caerulea,* размножаемых после депонирования и при нормальных условиях

Сорт		Высота микропобегов, см	Количество микропобегов, шт.	Коэффициент размножения
Галочка	После депонирования	5,9 ± 1,7	3,4 ± 2,0	10,4 ± 3,5
	Контроль	5,2 ± 2,0	5,2 ± 1,0	12,0 ± 2,5
Камчадалка	После депонирования	4,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	5,0 ± 0,4
	Контроль	3,5 ± 0,5	2,0 ± 0,2	5,5 ± 0,3
Люлия	После депонирования	4,3 ± 1,0	3,3 ± 1,5	11,0 ± 2,5
	Контроль	3,2 ± 0,2	3,3 ± 0,5	9,6 ± 1,0
Московская 23	После депонирования	6,5 ± 1,8	3,4 ± 2,0	11,1 ± 3,0
	Контроль	6,3 ± 1,3	3,6 ± 1,5	11,0 ± 3,5

Экспланты, пересаженные после депонирования в условия культуральной комнаты (температура 25±2°С), образовывали микропобеги без морфологических нарушений (рис. 2).

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

Рис. 2. Регенерация микропобегов сортов *L. caerulea* после длительного хранения
Примечания: А – сорт Галочка, Б – Камчадалка, В – Люлия, Г – Московская 23; 1 – контроль, 2 – растения-регенеранты после депонирования.

Выводы

В результате проведенных исследований по депонированию сортов *L. caerulea* в условиях замедленного роста в культуре *in vitro* установлено влияние генотипа и типа ретарданта на жизнеспособность эксплантов. Наибольшей жизнеспособностью характеризовались микропобеги сорта Московская 23 (36,0%). Для снижения ростовых процессов рекомендуется использовать ретардант хлорхолинхлорид в концентрации 0,4 г/л. Экспланты жимолости сохраняют регенерационный потенциал после 10 месяцев депонирования при температуре +10°С.

Список использованных источников

1. Сорокопудов В.Н., Куклина А.Г., Упадышев М.Т. Сорта съедобной жимолости: биология и основы культивирования: монография - М.: ФГБНУ ВСТИСП, 2018. – 160 с. ISBN: 978-5-00140-012-7

2. Хохрякова Л.А. Новые сорта жимолости как основа Индустриальной технологии возделывания культуры // Современные проблемы возделывания сельскохозяйственных культур и пути повышения величины и качества урожая. - 2006. – № 7. – С. 147–149.

3. Гидзюк И.К. Жимолость со съедобными плодами. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1981. – 168 с.

4. Thompson M., Chaovanalikit A. Preliminary observations on adaptation and nutraceutical values of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea*) in Oregon // Acta Hortic. - 2003. – N 626. – P. 65–72. DOI: 10.17660/ActaHortic.2003.626.8

5. Пигуль М.Л., Шалкевич М.С. Продуктивность жимолости синей (*Lonicera caeruleae* L.) // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. – № 2.– С. 47–50. ISSN: 2076-5215

6. Svarcova I., Heinrich J., Valentova K. Berry fruits as a source of biologically active compounds: The case of *Lonicera caerulea* // Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. – 2007. - Vol. 151. - N 2. - P. 163-174. DOI: 10.5507/bp.2007.031

7. Skupień K. et al. Characterization of selected physico-chemical features of blue honeysuckle fruit cultivar Zielona // Pol. J. Nat. Sci. – 2007. – Vol. 4. – P. 101-107.

8. Jurikova T., Rop O., Mlcek J., Sochor J., Balla S., Szekeres L., Hegedusova A., Hubalek J., Adam V., Kizek R. Phenolic profile of edible honeysuckle berries (genus *Lonicera*) and their biological effects // Molecules. – 2012. – Vol. 17. – №. 1. – P. 61-79. DOI: 10.3390/molecules17010061

9. Becker R., Szakiel A. Phytochemical characteristics and potential therapeutic properties of blue honeysuckle *Lonicera caerulea* L.(Caprifoliaceae) // Journal of Herbal Medicine. – 2019. – Vol. 16. – P. 100237. DOI: 10.1016/j.hermed.2018.10.002

10. Grobelna A., Kalisz S., Kieliszek M. Effect of processing methods and storage time on the content of bioactive compounds in blue honeysuckle berry purees // Agronomy. – 2019. – Vol. 9. – №. 12. – P. 860. DOI: 10.3390/agronomy9120860

11. Gołba M., Sokół-Łętowska A., Kucharska A. Health Properties and Composition of Honeysuckle Berry *Lonicera caerulea* L. // Molecules. - 2012. – N. 25. – P. 4467–4477. DOI: 10.3390/molecules25030749

12. Romano A. Conservasao *in vitro* de germeplasma de sobreiro (*Quercus suber* L.) // J. Rev. Biol. - 1994. - N 1-4. - P. 29-42.

13. Митрофанова И.В. Основы создания генобанка *in vitro* декоративных, ароматических, плодовых культур и дикорастущих видов растений в Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре РАН // Наследие академика Н.В. Цицина. Современное состояние и перспективы развития. – 2019. – С. 113-115.

14. Blaich R. Recherches sur les cultures de meristemes et d'organes de vinge *in vitro* en vue de la selection et de la conservation de genotypes // Bull O.I.V. – 1985. – Vol. 58. – N 650-651. - P. 391–395.

15. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Бурдаева Л.М. Методы культуры ткани в лесной генетике и селекции // II Лесхоз, информация. - 2002. -№ 6. - С. 40.

16. Самсонова О.Н., Трушечкин В.Т. Старение растений земляники *Fragaria ananassa* Duch. при хранении *in vitro* // Новое в ягодоводстве Нечерноземья: Сб. науч. тр. НИЗИСНП. - М., 1990. - С. 35-44.

17. El-Gizawy A.M., Ford-Lloyd B.V. An in vitro method for the conservation and

storage of garlic (*Allium sativum*) germplasm // Plant cell, tissue and organ culture. – 1987. – Vol. 9. – №. 2. – P. 147-150. DOI: 10.1007/BF00044250

18. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2011. – № 47. – P. 5–16. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2

19. Cruz-Cruz C.A., Gonzalez-Arnao M.T., Engelmann F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity // Resources. – 2013. – № 2. – P. 73–95. DOI: 10.3390/resources2020073

20. Chauhan R., Singh V., Quraishi A. In vitro conservation through slow-growth storage // In: Faisal M., Alatar A. (eds). Synthetic seeds. Springer Nature Switzerland AG. – 2019. – P. 397–416. DOI: 10.1007/978-3-030-24631-0_19

21. Молканова О.И., Коновалова Л.Н., Стахеева Т.С. Особенности размножения и сохранения коллекции ценных и редких видов растений в условиях *in vitro* // Бюллетень государственного Никитского ботанического сада. – 2016. - № 120. - С. 17–23.

22. Спиридович Е.В., Фоменко Т.И., Власова А.Б., Козлова О.Н., Вайновская И.Ф., Юхимук А.Н., Кузьменкова С.М., Носиловский О.А., Решетников В.Н. Асептическая коллекция и банк ДНК центрального ботанического сада НАН Беларуси как эффективные инструменты сохранения редких растений // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. – 2017. – № 3. – С. 117–128. ISSN 1029-8940

23. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н., Браилко В.А., Лесникова-Седошенко Н.П. Моделирование контролируемых условий, необходимых для адаптации и длительного хранения растительного материала декоративных, ароматических и плодовых культур в генобанке *in vitro*: методические рекомендации / под общ. ред. И.В. Митрофановой. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», – 2018. – С. 72. DOI: 10.32514/978-5-907118-88-1

24. Sedlák J., Paprštein F. *In vitro* propagation of blue honeysuckle // Horticultural Science. – 2007. – Vol. 34. – N. 4. – P. 129. DOI:10.17221/1871-HORTSCI

25. Fira A.I., Clapa D., Cristea V., Plopa C. *In vitro* propagation of *Lonicera kamtschatica* // Agriculture-Science and Practice. – 2014. – N. 1-2. – P. 89-90. ISSN: 1221-5317

26. Dziedzic E. Propagation of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Pojark.) in *in vitro* culture // Journal of fruit and ornamental plant research. – 2008. – Vol. 16. – P. 93-100.

27. Krupa-Małkiewicz M., Ochmian I. Propagation of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) in *in vitro* culture // Journal of Basic and Applied Sciences. – 2014. – Vol. 10. – P. 164-169. DOI: 10.6000/1927-5129.2014.10.22

28. Бъядовский И.А. Влияние жасмоновой кислоты и пониженной температуры на длительность хранения жимолости (*Lonicera*) в культуре *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. – 2018. – Т. 55. – С. 64-68. DOI: 10.31676/2073-4948-2018-55-64-68

29. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их

основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

30. Молканова О.И., Королева О.В., Стахеева Т.С., Крахмалева И.Л., Мелещук Е.А. Совершенствование технологии клонального микроразмножения ценных плодовых и ягодных культур для производственных условий // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32. – №. 9. DOI: 10.24411/0235-2451-2018-10915

31. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia plantarum. – 1962. – Vol. 15. – №. 3. – P. 473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

32. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие. – М.: Высшая школа, 1980. – 352 с.

==========

Цитирование:

Орлова Н.Д., Раева-Богословская Е.Н., Молканова О.И., Мирошниченко А.С., Гусева М.В. Особенности депонирования некоторых сортов *Lonicera caerulea* L. в культуре *in vitro* [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2022. – № 2. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2022/2/st_210.pdf. DOI: https://doi.org/10.51419/202122210.