

Екатерина Николаевна Раева-Богословская^{1✉}, Наталия Дмитриевна Орлова²,
Анна Сергеевна Мирошниченко³, Ольга Ивановна Молканова⁴

^{1,2,3,4}Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва, Россия

¹katyaraeva@rambler.ru

²irosvet@mail.ru

³anya.mirosh@gmail.com

⁴molkanova@mail.ru

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РАЗМНОЖЕНИЕ ГИБРИДНЫХ СОРТОВ КНЯЖЕНИКИ *IN VITRO*

Цель исследования – усовершенствование технологии клонального микроразмножения княженики для массового получения посадочного материала. Исследования проводили в 2022–2023 гг. в лаборатории биотехнологии растений Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина Российской академии наук (ГБС РАН). В опыте были использованы гибридные сорта *Rubus arcticus* L.: *Beata*, *Sofia*, *Anna* и *Astra*. Изучено влияние различных регуляторов роста и их концентраций на регенерацию эксплантов *R. arcticus* L. При культивировании на питательных средах с различными концентрациями 6-бензиламинопурина (6-БАП) не было установлено существенного различия по числу микропобегов у сортов княженики. На питательной среде с добавлением 1,0 мг/л 6-БАП экспланты княженики образовывали максимальное число микропобегов (2,93 шт.). Отмечено значительное влияние типа цитокинина и их сочетаний на коэффициент размножения, высоту и число микропобегов княженики. Культивирование на питательной среде с добавлением 1,0 мг/л тидиазурона и 6-БАП способствовало образованию наибольшего числа микропобегов ((4,33 ± 0,88) шт.) и максимальному коэффициенту размножения (14,33 ± 0,84) у княженики *in vitro*. Установлено значительное влияние генотипа и регуляторов роста на укореняемость микропобегов *R. arcticus*. Наименьшим процентом укоренившихся микропобегов характеризовался сорт *Beata* (61,5 %), средними значениями – *Anna* (65 %) и *Astra* (72 %), максимальным – *Sofia* (77 %). Питательная среда с добавлением 0,5 мг/л ИУК способствовала активному укоренению микропобегов княженики (82 %).

Ключевые слова: *Rubus arcticus*, клональное микроразмножение, цитокинины, ауксины, коэффициент размножения, укореняемость

Для цитирования: Влияние регуляторов роста на размножение гибридных сортов княженики *in vitro* / Е.Н. Раево-Богословская [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2024. № 12. С. 43–49. DOI: 10.36718/1819-4036-2024-12-43-49.

Благодарности: работа выполнена в рамках Государственного задания ГБС РАН № 122042700002-6.

Ekaterina Nikolaevna Raeva-Bogoslovskaya^{1✉}, Natalia Dmitrievna Orlova²,
Anna Sergeevna Miroshnichenko³, Olga Ivanovna Molkanova⁴

^{1,2,3,4}N.V. Tsitsin Main Botanical Garden, the RAS, Moscow, Russia

¹katyaraeva@rambler.ru

²irosvet@mail.ru

³anya.mirosh@gmail.com

⁴molkanova@mail.ru

INFLUENCE OF GROWTH REGULATORS ON *IN VITRO* PROPAGATION OF ARCTIC BRAMBLE HYBRIDS

The aim of the study is to improve the technology of clonal micropropagation of Arctic bramble for mass production of planting material. The studies were conducted in 2022–2023 in the Laboratory of Plant Biotechnology of the N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences (MBG RAS). Hybrid varieties of *Rubus arcticus* L. were used in the experiment: Beata, Sofia, Anna, and Astra. The effect of various growth regulators and their concentrations on the regeneration of *R. arcticus* L. explants was studied. When cultivating on nutrient media with different concentrations of 6-benzylaminopurine (6-BAP), no significant difference was found in the number of microshoots between Arctic bramble varieties. On a nutrient medium with the addition of 1.0 mg/l 6-BAP, Arctic bramble explants formed the maximum number of microshoots (2.93 pcs.). A significant influence of the type of cytokinin and their combinations on the reproduction rate, height and number of microshoots of Arctic bramble was noted. Cultivation on a nutrient medium with the addition of 1.0 mg/l thidiazuron and 6-BAP contributed to the formation of the greatest number of microshoots (4.33 ± 0.88 pcs.) and the maximum multiplication coefficient (14.33 ± 0.84) in Arctic bramble *in vitro*. A significant effect of the genotype and growth regulators on the rooting of *R. arcticus* microshoots was established. The Beata variety had the lowest percentage of rooted microshoots (61.5 %), average values were found in Anna (65 %) and Astra (72 %), and the maximum was found in Sofia (77 %). A nutrient medium with the addition of 0.5 mg/l IAA contributed to the active rooting of Arctic bramble microshoots (82 %).

Keywords: *Rubus arcticus*, clonal micropropagation, cytokinins, auxins, multiplication coefficient, rooting

For citation: Influence of growth regulators on *in vitro* propagation of arctic bramble hybrids / E.N. Raevo-Bogoslovskaya [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2024;(12): 43–49 (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2024-12-43-49.

Acknowledgments: the work has been carried out within the framework of the State Assignment of the MBG RAS (№122042700002-6).

Введение. На сегодняшний день возрастает интерес к малораспространенным культурам с высоким содержанием биологически активных веществ и уникальными вкусовыми качествами. Одной из таких культур является княженика (*Rubus arcticus* L.).

R. arcticus представляет собой невысокое, до 30 см, многолетнее растение с тонким ползучим корневищем, образующим выводковые почки. Княженика цветет в июне-июле розовыми цветками. Плоды, темно-пурпурные, похожие на малину, созревают в июле-сентябре. Ареал княженики простирается в субарктическом поясе Евразии и Северной Америки [1].

Отличительной особенностью *R. arcticus* является вкус и аромат плодов, который обусловлен комбинацией из более 60 различных ароматических соединений [2]. Содержащиеся в листьях флавоноиды и сапонины, а в плодах производные фурана, фенолы и антоцианы, и другие биологически активные вещества оказывают противовоспалительное и радиопротекторное действие [3]. Таким образом, растение *R. arcticus* является ценным сырьем не только для изготовления продуктов питания и виноделия, но и для фармацевтического производства.

Княженику можно использовать и как декоративную культуру. В естественных условиях

произрастания встречаются экземпляры с махровыми светло-лиловыми цветками, которые можно использовать как цветовой акцент в альпийских горках и рокариях. Растение подходит для моновидовых композиций [4].

Несмотря на большое число хозяйственно ценных качеств, промышленные насаждения *R. arctica* немногочисленны и расположены, преимущественно, в странах Северной Европы. Возможно, это связано с низкой урожайностью и прихотливостью растения вначале введения в культуру. Mespi и Mesma были первыми культиварами, полученными в Финляндии на основе *R. arctica*. Последующее скрещивание *R. arctica* с *R. arcticus* subsp. *stellatus* (Sm.) B. Voivin позволило создать сорта с большим размером плодов, но все еще уступающих по урожайности другим представителям рода *Rubus*. Селекция *R. arctica* ведется и в России. Так, Д.Н. Зонтиковым и другими предложена методика получения гаплоидных растений *R. arcticus* для последующего создания гибридных линий [5, 6].

Традиционные способы вегетативного размножения княженики не способны удовлетворить повышающийся спрос на посадочный материал. Кроме этого, плантациям *R. arcticus* свойственно быстро истощаться: через 3–4 года урожайность культуры резко снижается, а осушение ее естес-

твенных мест обитания и вытаптывание лесных угодий способствуют постепенному исчезновению княженики из дикой природы [7].

Таким образом, разработка протоколов клонального размножения *in vitro* княженики, позволяющих получать в относительно короткое время большое количество генетически однородного, оздоровленного посадочного материала становится важной для промышленного производства [8].

Некоторые особенности культивирования *R. arcticus in vitro* были изучены зарубежными и отечественными учеными. В исследованиях Harri I. Kokko и др. успешно размножали *R. Arcticus* и *R. saxatilis* на питательной среде с добавлением 6-бензиламинопурина в концентрации 1,5 мг/л [9]. Этапы собственно клонального микроразмножения и укоренения описаны в работах С.С. Макарова и Д.Н. Зонтикова [10, 11]. Однако данные по оптимальным регуляторам роста для культивирования *R. arcticus in vitro* не однозначны, что делает актуальным дальнейшее совершенствование протокола клонального микроразмножения княженики.

Цель исследования – усовершенствование технологии клонального микроразмножения княженики для массового получения посадочного материала.

Объекты и методы. Исследования проводили в 2023–2024 гг. в лаборатории биотехнологии растений ГБС РАН. В качестве объектов исследования использованы сорта, относящиеся к гибридам *R. Arcticus* × *R. arcticus* subsp. *stellatus*: Beata, Sofia, Anna и Astra.

На этапе собственно микроразмножения применяли минеральную основу питательной среды Murashige and Skoog (MS).

В первом опыте проводили сравнение различных концентраций 6-БАП: 0,3; 0,5; 1,0 мг/л и

безгормональной питательной среды в качестве контрольного варианта.

Во втором опыте оценивали действие различных цитокининов (6-БАП, тидиазурон (ТДЗ), метатополин (МТ)) и их сочетаний в концентрации 1,0 мг/л на морфогенез сортов княженики *in vitro*. Через 45 дней учитывали высоту микропобегов, число микропобегов и коэффициент размножения. Коэффициент размножения рассчитывали, как произведение среднего числа эксплантов, полученных с одного микропобега, и числа микропобегов, образованных у одного экспланта.

На этапе укоренения микропобеги княженики высаживали на питательную среду 1/2 MS с добавлением 20 г/л сахарозы. В исследовании анализировали влияние ИУК и ИМК в концентрациях 0,3 мг/л и 0,5 мг/л на укореняемость микропобегов.

Экспланты культивировали при температуре (23 ± 2) °С, фотопериоде 16/8 и освещенности 2000 лк. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ SPSS Statistics 23. Для сравнения средних величин и установления статистически значимых различий применяли множественный ранговый критерий Дункана. Варианты опыта, отмеченные одинаковыми буквами, не имеют статистических различий при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Рост и развитие тканей растения на этапе собственно микроразмножения зависит от выбора оптимальных регуляторов роста и их концентрации [12]. При культивировании *in vitro* наиболее часто используют 6-БАП. В ходе изучения влияния концентраций 6-БАП на биометрические показатели эксплантов княженики, статистически значимые различия выявлены только по числу микропобегов (рис. 1).

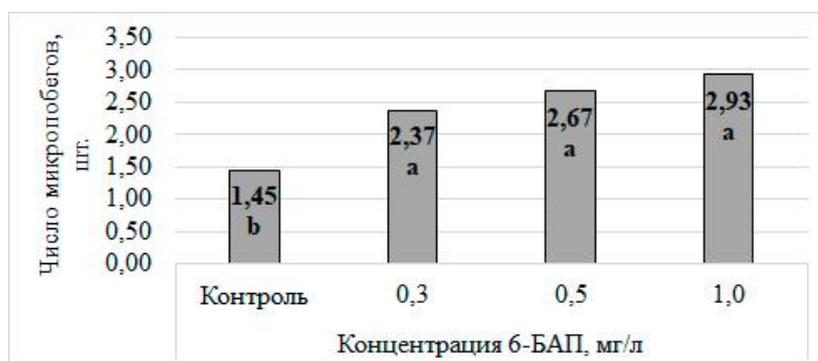


Рис. 1. Влияние концентраций 6-БАП на число микропобегов княженики в культуре *in vitro* (различными буквами обозначены варианты, имеющие значимые различия по критерию Дункана при $p < 0,05$)

В ходе дисперсионного анализа установлено существенное различие по числу микропобегов между контрольным вариантом опыта и вариантами с добавлением 6-БАП в различных концентрациях в состав питательной среды. Однако, экспланты, культивируемые на питательных средах с различной концентрацией 6-БАП, статистически не различались по данному показателю. Использование 6-БАП стимулировало образование адвентивных микропобегов при любой концентрации, максимальное число микропобегов получено на питательной среде с добавлением 1,0 мг/л 6-БАП и составило 2,93 шт. При культивировании на питательной среде без добавления 6-БАП экспланты княженики образовывали минимальное число микропобегов – 1,45 шт. Это

согласуется с работами других ученых. Для некоторых представителей рода *Rubus* оптимальной является концентрация в питательной среде 6-БАП в пределах от 0,5 до 1,5 мг/л [13]. Для дальнейшего изучения влияния источников цитокинина на размножение княженики *in vitro* выбрана концентрация 1,0 мг/л.

Некоторые исследователи отмечали положительный эффект при совместном использовании в питательной среде на этапе микроразмножения двух источников цитокинина [14]. В ходе опыта установлены существенные различия по высоте, числу микропобегов и коэффициенту размножения княженики, при использовании различных цитокининов и их сочетаний (табл.).

Влияние различных цитокининов и их сочетаний на биометрические показатели эксплантов княженики

Источник цитокинина*	Высота микропобегов, мм	Число микропобегов, шт.	Коэффициент размножения
6-БАП	19,44±0,83a	2,56±0,73e	11,11±2,91g
ТДЗ	14,16±1,07c	2,70±0,38e	12,63±1,63fg
мТ	18,06±0,97ab	2,12±0,34e	10,29±0,69g
6-БАП+мТ	18,05±0,73ab	2,00±0,28e	10,80±1,14g
6-БАП+ТДЗ	13,33±1,67c	4,33±0,88d	14,33±0,84f
мТ+ТДЗ	15,85±0,90bc	3,11±0,45de	12,33±1,64fg

*Концентрация каждого регулятора роста в варианте – 1,0 мг/л. Различными буквами обозначены варианты, имеющие значимые различия по критерию Дункана при $p < 0,05$.

Однофакторный дисперсионный анализ показал существенные различия по биометрическим показателям эксплантов княженики при использовании различных источников цитокинина в составе питательной среды. При культивировании на питательной среде, содержащей 1,0 мг/л 6-БАП совместно с 1,0 мг/л ТДЗ, выявлено наибольшее число микропобегов (4,33 ± 0,88 шт.) и максимальный коэффициент размножения (14,33 ± 0,84). Стоит отметить снижение высоты микропобегов при культивировании на питательных средах с добавлением ТДЗ, высота микропобегов варьировала в пределах от 13,33 до 14,6 мм. Схожие результаты были получены Н.В. Соловых при культивировании малины душистой: ТДЗ способствовал снижению высоты микропобегов [15]. Применение мТ при клональном микроразмножении княженики оказался малоэффективен, но может быть при-

менен совместно с другими цитокининами, так как способствовал увеличению высоты микропобегов.

Этап укоренения важен для последующего культивирования регенерантов в условиях *ex vitro*. Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние генотипа и источника ауксина на укореняемость микропобегов различных сортов княженики. Сорта княженики различались по способности к корнеобразованию (рис. 2).

Наибольшим процентом укоренившихся микропобегов характеризовался сорт Sofia (77 %), минимальным – сорта Beata и Anna (62 и 65 % соответственно). Сорт Astra занимал промежуточное значение – 72 %.

В нашем исследовании укореняемость микропобегов княженики зависела от применяемого ауксина и его концентрации (рис. 3).

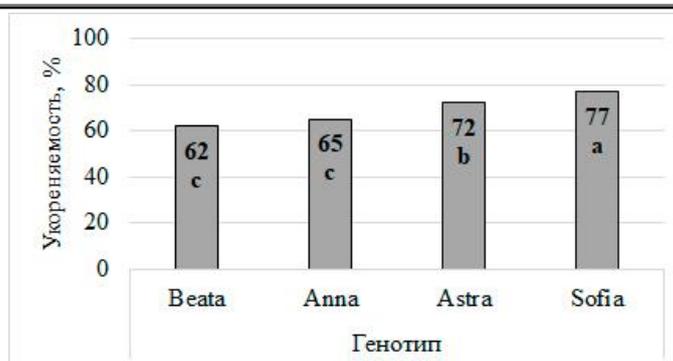


Рис. 2. Влияние генотипа на укореняемость микропобегов княженики (различными буквами обозначены варианты, имеющие значимые различия по критерию Дункана при $p < 0,05$)

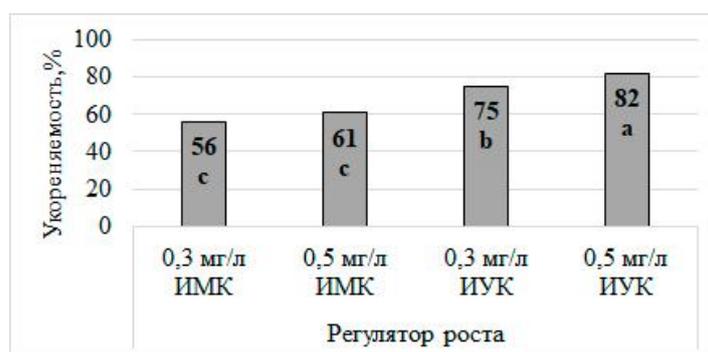


Рис. 3. Влияние концентрации регуляторов роста на укореняемость княженики *in vitro* (различными буквами обозначены варианты, имеющие значимые различия по критерию Дункана при $p < 0,05$)

В исследовании установлены существенные различия по укореняемости микропобегов княженики на питательных средах с 0,3 мг/л и 0,5 мг/л ИУК. В свою очередь, укореняемость эксплантов при использовании 0,3 и 0,5 мг/л ИМК статистически не различалась. Максимальная укореняемость микропобегов отмечена при культивировании микропобегов на питательной среде с 0,5 мг/л ИУК (82 %). Культивирование сортов княженики на питательных средах с добавлением ИМК в различных концентрациях не оказало значительного влияния на образование корней у микропобегов: укореняемость составила 56–61 %. Таким образом, использование 0,5 мг/л ИУК для укоренения сортов княженики повышает эффективность метода клонального микроразмножения.

Заключение. В ходе исследования был оптимизирован протокол культивирования *in vitro* сортов *Rubus arcticus*. На этапе собственно микроразмножения оптимально использование питательной среды, сочетающей 6-БАП и ТДЗ в концентрациях 1,0 мг/л.

Укореняемость сортов княженики зависит от генотипа и концентрации регулятора роста в питательной среде. Наибольшим процентом

укоренившихся микропобегов характеризовался сорт Sofia, оптимальным ауксином на этапе укоренения является ИУК в концентрации 0,5 мг/л.

Список источников

1. Hellqvist S. Establishment of hybrid arctic bramble under field conditions // Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science. 2000. Vol. 50 (3). P. 169–175.
2. Kallio H. Development of volatile aroma compounds in arctic bramble, *Rubus arcticus* L. // Journal of Food Science. 1976. Vol. 41. P. 563–566.
3. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Семейства Actinidiaceae – Malvaceae Euphorbiaceae – Haloragaceae / под ред. А.Л. Буданцева. СПб.; М.: КМК, 2009. Т. 2. 513 с.
4. Синельникова Н.В., Пахомов М.Н. Княженика (*Rubus arcticus* L.) в долине реки Колыма – сезонное развитие и плодоношение // Вестник КрасГАУ. 2023. №. 4. С. 100–105.

5. Яцына, А.А., Концевая И.И. Размножение и интродукция поляники (*Rubus arcticus* L.) в Беларуси // Плодоводство. 2004. Т. 15. С. 207–211.
6. Получение гаплоидных растений *Rubus arcticus* L. методом культуры микроспор *in vitro* / Д.Н. Зонтиков [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55, № 1. С. 128–136.
7. Гудовских Ю.В., Егорова Н.Ю., Егошина Т.Л. Состояние ценопопуляций *Rubus arcticus* (*Rosaceae*) в Кировской области // Ботанический журнал. 2020. Т. 105, № 8. С. 779–793.
8. Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов растений / О.И. Молканова [и др.] // Ботанический журнал. 2020. Т. 105, № 6. С. 610–619.
9. Kokko H. I., Kivineva M., Kärenlampi S.O. Single-step immunocapture RT-PCR in the detection of raspberry bushy dwarf virus // Biotechniques. 1996. Vol. 20(5) P. 842–846.
10. Зонтиков Д.Н., Зонтикова С.А., Малахова К.В. Влияние pH питательной среды на рост и развитие некоторых сортов *Vaccinium angustifolium* L. и *Rubus arcticus* L. при клональном микроразмножении // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2022. № 4. С. 31–41.
11. Макаров С.С., Кузнецова И.Б. Корнеобразование *in vitro* и адаптация *ex vitro* княженики арктической при клональном микроразмножении // Известия Оренбур. гос. аграр. ун-та. 2018. № 6 (74). С. 52–55.
12. Особенности регенерации перспективных сортов *Actinidia arguta* в культуре *in vitro* / Д.А. Семенова [и др.] // Таврический вестник аграрной науки. 2023. № 1 (33). С. 93–103.
13. Зонтиков Д.Н., Зонтикова С.А., Малахова К.В. Влияние состава питательных сред и регуляторов роста при клональном микроразмножении некоторых хозяйственно ценных представителей рода *Rubus* L. // Агрехимия. 2021. № 6. С. 36–42.
14. Бьядовский И.А. Влияние различных концентраций 6-бензиламинопурина и тидиазурина на коэффициент размножения клоновых подвоев яблони и груши в культуре *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2013. Т. 37, № 1. С. 52–56.
15. Соловых Н.В. Клональное размножение *in vitro* малины душистой // Международный журнал гуманитарных и естественных наук. 2023. № 8–2 (83). С. 22–26.

References

1. Hellqvist S. Establishment of hybrid arctic bramble under field conditions // Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science. 2000. Vol. 50 (3). P. 169–175.
2. Kallio H. Development of volatile aroma compounds in arctic bramble, *Rubus arcticus* L. // Journal of Food Science. 1976. Vol. 41. P. 563–566.
3. Rastitel'nye resursy Rossii: Dikorastuschie cvetkovye rasteniya, ih komponentnyj sostav i biologicheskaya aktivnost'. Semejstva Actinidiaceae – Malvaceae Euphorbiaceae – Haloragaceae / pod red. A.L. Budanceva. SPb.; M.: KMK, 2009. Т. 2. 513 s.
4. Sinel'nikova N.V., Pahomov M.N. Knyazhenika (*Rubus arcticus* L.) v doline reki Kolyma – sezonnoe razvitie i plodonoshenie // Vestnik KrasGAU. 2023. № 4. S. 100–105.
5. Яцына, А.А., Концевая И.И. Размножение и интродукция поляники (*Rubus arcticus* L.) в Беларуси // Плодоводство. 2004. Т. 15. С. 207–211.
6. Poluchenie gaploidnyh rastenij *Rubus arcticus* L. metodom kultury mikroskopov *in vitro* / D.N. Zontikov [i dr.] // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. 2020. Т. 55, № 1. S. 128–136.
7. Gudovskih Yu.V., Egorova N.Yu., Egoshina T.L. Costoyanie cenopopulyacij *Rubus arcticus* (*Rosaceae*) v Kirovskoj oblasti // Botanicheskij zhurnal. 2020. Т. 105, № 8. S. 779–793.
8. Primenenie biotehnologicheskikh metodov dlya sohraneniya genofonda redkih vidov rastenij / O.I. Molkanova [i dr.] // Botanicheskij zhurnal. 2020. Т. 105, № 6. S. 610–619.
9. Kokko H. I., Kivineva M., Kärenlampi S.O. Single-step immunocapture RT-PCR in the detection of raspberry bushy dwarf virus // Biotechniques. 1996. Vol. 20(5) P. 842–846.
10. Zontikov D.N., Zontikova S.A., Malahova K.V. Vliyanie rH pitatel'noj sredy na rost i razvitie nekotoryh sortov *Vaccinium angustifolium* L. i *Rubus arcticus* L. pri klonal'nom mikrorazmnozenii // Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-

- issledovatel'skogo instituta lesnogo hozyajstva. 2022. № 4. S. 31–41.
11. *Makarov S.S., Kuznecova I.B.* Korneobrazovanie *in vitro* i adaptaciya *ex vitro* knyazheniki arkticheskoy pri klonal'nom mikrorazmnozhenii // *Izvestiya Orenbur. gos. agrar. un-ta.* 2018. № 6 (74). S. 52–55.
 12. Osobennosti regeneratsii perspektivnykh sortov *Actinidia arguta* v kul'ture *in vitro* / *D.A. Semenova* [i dr.] // *Tavricheskiy vestnik agrarnoy nauki.* 2023. № 1 (33). S. 93–103.
 13. *Zontikov D.N., Zontikova S.A., Malahova K.V.* Vliyaniye sostava pitatel'nykh sred i regulyatorov rosta pri klonal'nom mikrorazmnozhenii nekotorykh hozyajstvenno cennykh predstavitelej roda *Rubus* L. // *Agrohimiya.* 2021. № 6. S. 36–42.
 14. *B'yadovskiy I.A.* Vliyaniye razlichnykh koncentraciy 6-benzilaminopurina i tidiazurona na ko'efficient razmnozheniya klonovykh podvoev yabloni i grushi v kul'ture *in vitro* // *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii.* 2013. T. 37, № 1. S. 52–56.
 15. *Solovyh N.V.* Klonal'noe razmnozhenie *in vitro* maliny dushistoy // *Mezhdunarodnyy zhurnal gumanitarnykh i estestvennykh nauk.* 2023. № 8-2 (83). S. 22–26.

Статья принята к публикации 08.11.2024 / The article accepted for publication 08.11.2024.

Информация об авторах:

Екатерина Николаевна Раева-Богословская¹, научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений

Наталья Дмитриевна Орлова², младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений

Анна Сергеевна Мирошниченко³, инженер лаборатории биотехнологии растений

Ольга Ивановна Молканова⁴, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений, кандидат сельскохозяйственных наук

Information about the authors:

Ekaterina Nikolaevna Raeva-Bogoslovskaya¹, Researcher at the Plant Biotechnology Laboratory

Natalia Dmitrievna Orlova², Junior Researcher, Plant Biotechnology Laboratory

Anna Sergeevna Miroshnichenko³, Plant Biotechnology Laboratory Engineer

Olga Ivanovna Molkanova⁴, Leading Researcher at the Laboratory of Plant Biotechnology, Candidate of Agricultural Sciences

