

---

## БИОТЕХНОЛОГИЯ

---

УДК 674.031.973+57.085.23

### ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ *Loniceræ caerulea* L. СОРТА МИЧУРИНСКОЕ ДИВО В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

© Н. И. Степченко, Е. В. Немцова  
N. I. Stepchenko, E. V. Nemtsova

The influence of a tissue culture media-composition on the microclonal propagation  
of *Lonicera caerulea* L. var. Michurinskoye divo cultivated *in vitro*

ФГБОУ «Брянский государственный университет имени академика И. Г. Петровского», кафедра биологии  
241036, Россия, г. Брянск, ул. Бежичская, д. 14. Тел.: +7 (4832) 66-68-34, e-mail: elenanemz@mail.ru

Аннотация. В статье представлены результаты изучения влияния состава питательной среды на клональное микроразмножение растений *Lonicera caerulea* L. сорта Мичуринское диво в культуре *in vitro*. При анализе влияния регуляторов роста цитокининовой природы на коэффициент размножения существенное различие установили для 6-БАП (1 мг/л): наибольшее количество побегов формировалось при добавлении в питательную среду цитокинина 6-БАП в концентрации 1 мг/л и достигало в среднем 8,5 шт. и 8,4 шт. на одно растение на питательных средах MS и QL соответственно. Это в 3,7 и 3,5 раз больше, чем при культивировании с добавлением кинетина в концентрации 1 мг/л. Существенного влияния типа питательной среды MS или QL на коэффициент размножения обнаружено не было. Средняя длина микропобегов жимолости была наибольшей при добавлении кинетина 1 мг/л и составляла 2,35 и 2,4 см для питательной среды MS и QL соответственно. Это в 2,18 и 1,92 раза больше, чем при использовании 6-БАП в концентрации 1 мг/л. При культивировании на среде с цитокинином 6-БАП наблюдалось образование конгломерата из микропобегов с укороченными междоузлиями и малой поверхностью листьев, по сравнению с другими вариантами.

Ключевые слова: *Lonicera caerulea*, *in vitro*, клональное микроразмножение, регуляторы роста.

Annotation. The article presents the results of the influence of the tissue culture medium exposition on the microclonal propagation of *Lonicera caerulea* L. var. Michurinskoye Divo. When analyzing the influence of growth regulators of a cytokinin nature on the reproduction coefficient, a significant difference has been for 6-BAP (1 mg/l): the largest number of shoots was formed when cytokinin 6-BAP was added to the nutrient medium at a concentration of 1 mg/l and reached on average 8,5 pcs. and 8,4 pcs. per plant on MS and QL nutrient media, respectively. This is 3,7 and 3,5 times more than with the addition of kinetin at a concentration of 1 mg/l. There was no significant effect of MS or QL culture medium type on the multiplication rate. The average length of honeysuckle microshoots was the greatest with the addition of 1 mg/l kinetin and was 2,35 and 2,4 cm for the MS and QL nutrient medium, respectively. This is 2,18 and 1,92 times more than when using 6-BAP 1 mg/l. When cultivated on a medium with cytokinin 6-BAP, the formation of a conglomerate of microshoots with shortened internodes and a small leaf surface was characteristic, compared to other options.

Keywords: *Lonicera caerulea*, *in vitro*, clonal micropropagation, growth regulators.

DOI: 10.22281/2686-9713-2024-1-98-103

### Введение

Клональное микроразмножение – это современный метод вегетативного размножения растений, который позволяет намного быстрее получить качественный посадочный материал для производства, чем того требуют традиционные методы. Получение данным методом растений генетически идентичных исходному родительскому варианту сохраняет ценность того или иного сорта. Для многих плодово-ягодных растений существуют разработанные протоколы

размножения в культуре *in vitro*. Метод культуры клеток и тканей позволяет наладить массовое производство высококачественного посадочного материала сортов из единичных исходных экземпляров. При этом в процессе микроразмножения необходимо учитывать видо- и сортоспецифичные требования культуры к питательным элементам в субстрате для того, чтобы повысить качественные или количественные характеристики. Поэтому перед научными группами на данный момент встают вопросы оптимизации методов размножения садовых культур *in vitro*, а также способы снижения себестоимости посадочного материала (Muratova, 2017; Makarov, Kusnetsova, 2018; Kolbanova, 2020). При использовании клонального микроразмножения получают генетически однородный посадочный материал, при этом сохраняются сортовые свойства растения-донора, а также обеспечивается быстрый переход растения к репродуктивной фазе развития (Makarov, Kalashnikova, 2017).

Жимолость голубая (*Lonicera caerulea* L., *Caprifoliaceae* Juss.) – ценное пищевое растение. Обладая высокой зимостойкостью (до  $-50^{\circ}\text{C}$ ), теневыносливостью, скороспелостью, неприхотливостью к почвенным и климатическим условиям, ранним сроком созревания ягод и высокой пищевой ценностью, культура имеет коммерческую привлекательность. Для плодов жимолости характерно высокое содержание биологически активных веществ, макро- и микроэлементов (содержание сухого вещества – 11,6–16,4%, органических кислот – до 5,3%, сахаров – 2,9–12,5%, магния – до 21,7 мг/100 г, натрия – до 35,2 мг/100 г, калия – до 70,3 мг/100 г) (Kulikova et al., 2021; Orlova et al., 2022).

В направлении размножения жимолости методами биотехнологии достигнуты определённые успехи. Работы по клональному микроразмножению проводятся как в России, так и за рубежом. Например, известны технологии размножения через активацию развития существующих меристем, индукцию образования адвентивных почек, а также через первичную и пересадочную каллусную культуру. Однако предлагаемые протоколы не в полной мере реализуют морфогенетический потенциал растения, что отражается на длительности этапов технологии, в частности, собственно микроразмножения, укоренения и адаптации. Кроме того, экономическая эффективность клонального микроразмножения зависит не только от качества посадочного материала, но и от его количества. Поэтому усовершенствование этапа микроразмножения, на котором обеспечивается получение высокого коэффициента размножения, остается важной задачей (Makarov, Kuznetsova, 2018; Kulikova et al., 2021; Orlova et al., 2022).

Целью данной работы являлось изучение влияния состава питательной среды на клональное микроразмножение растений *Lonicera caerulea* сорта Мичуринское диво в культуре *in vitro*.

### Методика работы

Для клонального микроразмножения в качестве первичных эксплантов использовали апекс растений с листовыми примордиями и боковые почки вегетирующих побегов. Изолирование эксплантов проводили с одревесневших побегов, заготовленных в ранневесенний период (март 2022 г.).

На этапе «собственно микроразмножение» изучалось влияние питательной среды и регуляторов роста на процесс органогенеза жимолости. Культивирование микрочеренков жимолости Мичуринское диво в условиях *in vitro* проводили на питательной среде, содержащей минеральные соли и витамины по прописи Мурасига и Скуга (MS) и Кворина-Лепуавра (QL) (Murashige, Skoog, 1962; Quoirin, Lepoivre, 1977). Для изучения влияния регуляторов роста на этапе «собственно микроразмножение» использовали цитокинины – кинетин и 6-БАП в концентрации по 1 мг/л. Для данного этапа использовали 6 вариантов питательных сред, учитывая повторности и контрольные варианты без регуляторов роста. Субкультивирование эксплантов в виде микрочеренков с 1–2 междоузлиями на свежую питательную среду осуществляли каждые 4 недели. Через 35 суток с момента высадки эксплантов проводили расчёт коэффициента размножения, а также наблюдение за динамикой роста и морфологическими особенностями размноженных растений. Учитывали такие пока-

затели, как высота побегов и коэффициент размножения. Экспериментальные работы по культивированию изолированных тканей и органов растений проводили по классическим методикам (Butenko, 1999; Kalashnikova, 2023).

Все работы с изолированными тканями и органами выполняли в стерильных условиях ламинар-боксов БАВ нп-01-«Ламинар-С»-1,5 (Lamsystems, Россия). Перед началом работы ламинар-бокс облучали бактерицидными ультрафиолетовыми лампами в течение 20 мин. Для стерилизации внутренней поверхности ламинар-боксов и всего вносимого оборудования использовали этанол (70%). Питательные среды и дистиллированную воду стерилизовали в автоклаве при давлении 1 атм и температуре 120°C в течение 20 минут, посуду стерилизовали в сухожаровом шкафу при температуре 220°C в течение 2 часов.

Выращивание микропобегов жимолости проводили в условиях световой комнаты: температура помещения – 22–25°C, 16-ти часовой фотопериод, освещение люминесцентными лампами OSRAM L36/25 с интенсивностью освещения 2500–4000 лк. Эксперимент был проведён с двукратной повторностью, объём каждой выборки – 15 растений.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических критериев Стьюдента и Фишера, дисперсионный анализ данных двухфакторного опыта с полной рандомизацией вариантов осуществляли с помощью стандартных пакетов программы MS Excel. В таблице указаны средние арифметические величины, доверительный интервал, критерий Фишера, *p*-значение (Dospikhov, 2011). В работе обсуждали различия, достоверные при 5%-ом уровне значимости.

### Результаты и их обсуждение

По результатам проведённых экспериментальных исследований и дисперсионного анализа отмечено, что биометрические показатели *L. caerulea* различались в зависимости от наличия росторегулирующего фактора (табл. 1).

Таблица 1

Влияние минерального состава питательной среды и регуляторов роста на размножение *Lonicera caerulea* сорта Мичуринское диво в культуре *in vitro*

Table 1

The influence of the mineral tissue culture medium composition and growth regulators on the propagation of *Lonicera caerulea* var. Michurinskoye divo cultivated *in vitro*

Регуляторы роста	Минеральная основа			
	MS		QL	
	Высота побегов, см	Коэффициент размножения, шт./эксп	Высота побегов, см	Коэффициент размножения, шт./эксп
Контроль (без р/р)	1,02±0,06	1,27±0,17	1,40±0,21	1,23±0,16
Кинетин (1 мг/л)	2,35±0,33	2,35±0,34	2,40±0,32	2,4±0,32
6-БАП (1 мг/л)	1,08±0,08	8,50±0,53	1,25±0,15	8,4±0,51
Влияние минеральной основы и регуляторов роста на высоту микропобегов				
Вариант	<i>F</i>		<i>p</i>	
Минеральная основа	5,31		0,02	
Регуляторы роста	82,19		0,00	
Минеральная основа + Регуляторы роста	1,25		0,29	
НСР <sub>05</sub> = 0,3 ; НСР <sub>05A</sub> = 0,17 ; НСР <sub>05B</sub> = 0,21				
Влияние минеральной основы и регуляторов роста коэффициент размножения микропобегов				
Вариант	<i>F</i>		<i>p</i>	
Минеральная основа	0,01		0,94	
Регуляторы роста	938,00		0,00	
Минеральная основа + Регуляторы роста	0,16		0,85	
НСР <sub>05</sub> = 0,5 ; НСР <sub>A 05</sub> = 0,29 ; НСР <sub>B 05</sub> = 0,35				

Примечание:  $p \leq 0,05$ .

Дисперсионный анализ выявил, что имеются различия по высоте микропобегов для питательных сред MS и QL, а также отдельно для добавленных регуляторов роста ( $p \leq 0,05$ ). Различий не обнаружено при взаимодействии двух этих факторов, высота растений на безгормональной среде и среде с добавлением 6-БАП не имела существенных отличий. Средняя длина микропобегов жимолости была наибольшей при добавлении регулятора роста цитокининовой природы кинетина 1 мг/л и составляла 2,35 и 2,40 см для питательной среды MS и QL соответственно. Это в 2,18 и 1,92 раза больше, чем при использовании 6-БАП 1 мг/л (рис. 1). При культивировании на среде с цитокинином 6-БАП было характерно образование конгломерата из микропобегов с укороченными междоузлиями и малой поверхностью листьев, по сравнению с другими вариантами (рис. 2).

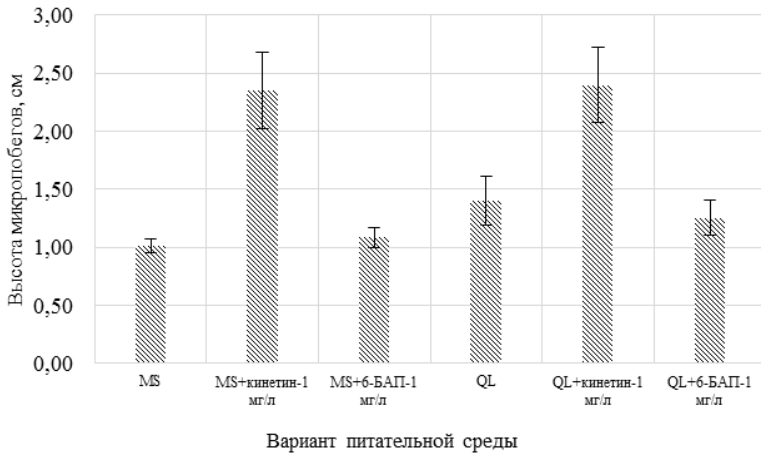


Рис. 1. Влияние гормонального состава питательной среды на морфометрические показатели (высота, см) микропобегов *Lonicera caerulea* сорта Мичуринское диво в культуре *in vitro*

Fig. 1. The influence of the hormonal tissue culture media composition on the growth parameters (height, cm) of mericlones of *Lonicera caerulea* var. Michurinskoye divo cultivated *in vitro*

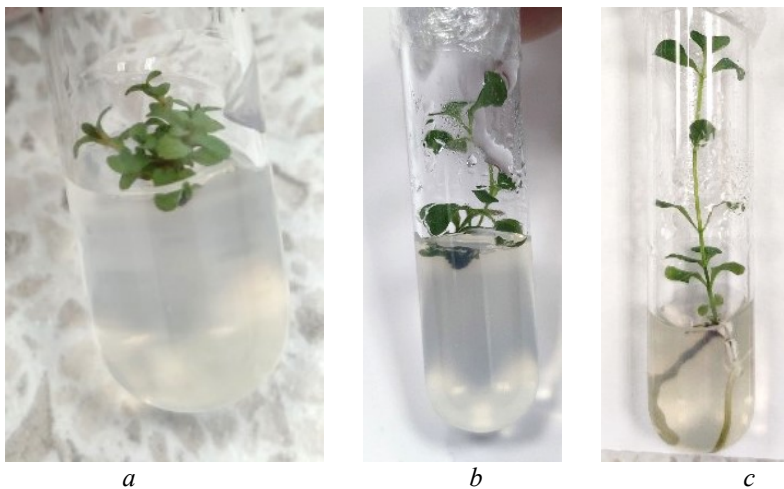


Рис. 2. Культивирование микропобегов *Lonicera caerulea* сорта Мичуринское диво на питательной среде MS с добавлением 6-БАП 1 мг/л (а), кинетина 1 мг/л (б) и контроль (без регуляторов роста) (с).

Fig. 2. The cultivation of mericlones of *Lonicera caerulea* var. Michurinskoye Divo on MS tissue culture medium with the addition of 6-BAP 1 mg/l (a), kinetin 1 mg/l (b) and control (without growth regulators) (c).

Дисперсионный анализ выявил, что на коэффициент размножения микропобегов в значительной мере влияет добавление только регулятора роста, а именно, 6-БАП, влияние сред MS и QL при этом не значимо ( $p \leq 0,05$ ). Наибольшее количество побегов формировалось при добавлении в питательную среду цитокинина 6-БАП в концентрации 1 мг/л и достигало в среднем 8,5 шт. и 8,4 шт. на одно растение на питательных средах MS и QL соответственно. Это в 3,7 и 3,5 раз больше, чем с добавлением кинетина в концентрации 1 мг/л (рис. 3).

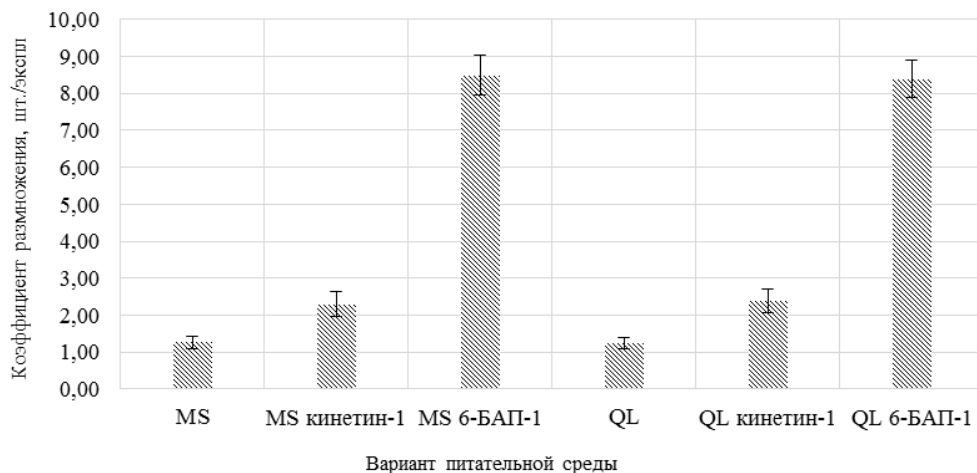


Рис. 3. Влияние гормонального состава питательной среды на коэффициент размножения (шт./экспл) микропобегов *Lonicera caerulea* сорта Мичуринское диво в культуре *in vitro*.

Fig. 3. The influence of the hormonal tissue culture medium composition on the reproduction rate (pcs./exp.) of mericlones of *Lonicera caerulea* var. Michurinskoe divo cultivated *in vitro*.

### Заключение

При анализе влияния регуляторов роста цитокининовой природы на коэффициент размножения *Lonicera caerulea* существенное различие установили для 6-БАП (1 мг/л): наибольшее количество побегов формировалось при добавлении в питательную среду цитокинина 6-БАП в концентрации 1 мг/л и достигало в среднем 8,5 шт. и 8,4 шт. на одно растение на питательных средах MS и QL соответственно. Это в 3,7 и 3,5 раз больше, чем при культивировании с добавлением кинетина в концентрации 1 мг/л. Существенного влияния типа питательной среды MS или QL на коэффициент размножения обнаружено не было. Средняя длина микропобегов жимолости была наибольшей при добавлении кинетина 1 мг/л и составляла 2,35 и 2,4 см для питательной среды MS и QL соответственно. Это в 2,18 и 1,92 раза больше, чем при использовании 6-БАП 1 мг/л. При культивировании на среде с цитокинином 6-БАП было характерно образование конгломерата из микропобегов с укороченными междоузлиями и малой поверхностью листьев, по сравнению с другими вариантами.

Большое значение при разработке и оптимизации методик клонального микроразмножения растения имеют генетические особенности вида и сорта. Этап «собственно микроразмножения» является важной стадией клонального микроразмножения, так как позволяет наиболее полно реализовать морфогенетический потенциал культуры. Поэтому разработка эффективных протоколов размножения ценных плодовых и ягодных культур продолжает быть актуальной.

### Список литературы

- [Butenko] Бутенко Р. Г. 1999. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС. 172 с.  
 [Kalashnikova] Калашникова Е. А. 2023. Клеточная инженерия растений: учебник и практикум для вузов. 2-е изд. М.: Изд. Юрайт. 333 с.

- [Dospikhov] Доспыхов Б. А. 2011. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). Изд. 6-е, стер., перепеч. с 5-го изд. 1985 г. М.: Альянс. С. 350–351.
- [Kolbanova] Колбанова Е. В. 2020. Влияние фитогормонов в составе питательной среды на пролиферацию у растений-регенерантов сортов жимолости синей (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica*) // Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. Т. 65. № 1. С. 88–97. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-88-97>
- [Kulikova] Куликова Е. И., Макаров С. С., Кузнецова И. Б., Чудецкий А. И. 2021. Особенности культивирования российских и зарубежных сортов жимолости съедобной (*Lonicera edulis* Turcz.) *in vitro* // Техника и технология пищевых производств. Т. 51. № 4. С. 712–722. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-712-722>
- [Makarov] Макаров С. С., Калиникова Е. А. 2017. Влияние состава питательной среды на клональное микро-размножение жимолости съедобной // Плодоводство и ягодоводство России. Т. XLIX. С. 217–222.
- [Makarov] Макаров С. С., Кузнецова И. Б. 2018. Влияние регуляторов роста на органогенез жимолости при клональном микроразмножении // Вестник Новосибирского гос. аграрного ун-та. Т. 49. № 4. С. 36–42. <https://doi.org/10.31677/2072-6724-2018-49-4-36-42>
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia plantarum*. V. 15. N. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- [Orlova] Орлова Н. Д., Раева-Богословская Е. Н., Молканова О. И. 2022. Совершенствование методики клонального микроразмножения перспективных сортов *Lonicera caerulea* L. // Лесной вестник. Т. 26. № 3. С. 85–92. DOI: 10.18698/2542-1468-2022-3-85-9
- Quoirin M., Lepoivre P. 1977. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. // *Acta Hort.* V. 78. P. 437–442.

## References

- Butenko R. G. 1999. *Biologiya kletok vysshikh rastenii in vitro i biotekhnologii na ikh osnove* [Biology of higher plant cells *in vitro* and biotechnology based on them]. Moscow: FBK-PRESS. 172 p. (In Russian)
- Kalashnikova E. A. 2023. *Kletochnaia inzheneriia rastenii: uchebnik i praktikum dlia vuzov* [Cellular engineering of plants: textbook and workshop for universities]. 2-e izd. Moscow: Izd. lurait. 333 p. (In Russian)
- Dospikhov B. A. 2011. *Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoi obrabotki rezul'tatov issledovaniia)* [Methodology of field experience (with the basics of statistical processing of research results)]. Izd. 6-e, ster., perepech. s 5-go izd. 1985 g. Moscow: Al'ians. P. 350–351. (In Russian)
- Kolbanova E. V. 2020. *Vliianie fitogormonov v sostave pitatel'noi sredy na proliferatsiiu u rastenii-regenerantov sortov zhimolosti sinei (Lonicera caerulea L. var. kamtschatica)* [The influence of phytohormones in the composition of the nutrient medium on the proliferation of regenerating plants of blue honeysuckle varieties (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica*)] // *Izv. NAN Belarusi. Ser. biol. nauk*. T. 65. № 1. P. 88–97. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-88-97> (In Russian)
- Kulikova E. I., Makarov S. S., Kuznetsova I. B., Chudetskii A. I. 2021. *Osobennosti kul'tivirovaniia rossiiskikh i zarubezhnykh sortov zhimolosti s'edobnoi (Lonicera edulis Turcz.) in vitro* [Features of the cultivation of Russian and foreign varieties of edible honeysuckle (*Lonicera edulis* Turcz.) *in vitro*] // *Tekhnika i tekhnologiiia pishchevykh proizvodstv*. T. 51. № 4. P. 712–722. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-712-722> (In Russian)
- Makarov S. S., Kalashnikova E. A. 2017. *Vliianie sostava pitatel'noi sredy na klona'noe mikrorazmnozhenie zhimolosti s'edobnoi* [The influence of the composition of the nutrient medium on the clonal micropropagation of edible honeysuckle] // *Plodovodstvo i iagodovodstvo Rossii*. T. XLIX. P. 217–222. (In Russian)
- Makarov S. S., Kuznetsova I. B. 2018. *Vliianie regulatorov rosta na organogenez zhimolosti pri klona'nom mikrorazmnozhenii* [The influence of growth regulators on the organogenesis of honeysuckle during clonal micropropagation] // *Vestnik Novosibirskogo gos. agrarnogo un-ta*. T. 49. № 4. P. 36–42. <https://doi.org/10.31677/2072-6724-2018-49-4-36-42> (In Russian)
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia plantarum*. V. 15. N. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Orlova N. D., Raeva-Bogoslvskaia E. N., Molkanova O. I. 2022. *Sovershenstvovanie metodiki klona'nogo mikrorazmnozheniia perspektivnykh sortov Lonicera caerulea L.* [Improving the technique of clonal micropropagation of promising varieties of *Lonicera caerulea* L.] // *Lesnoi vestnik*. T. 26. № 3. P. 85–92. DOI: 10.18698/2542-1468-2022-3-85-9 (In Russian)
- Quoirin M., Lepoivre P. 1977. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. // *Acta Hort.* V. 78. P. 437–442.

## Сведения об авторах

**Степченко Наталья Игоревна**  
магистрант кафедры биологии  
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет  
имени академика И. Г. Петровского», Брянск  
E-mail: silina.nata@mail.ru

**Немцова Елена Валентиновна**  
к. б. н., доцент кафедры биологии  
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет  
имени академика И. Г. Петровского», Брянск  
E-mail: elenanemz@mail.ru

**Stepchenko Natalia Igorevna**  
postgraduate of the Dpt. of Biology  
Bryansk State University named after Academician I. G. Petrovsky, Bryansk  
E-mail: silina.nata@mail.ru

**Nemtsova Elena Valentinovna**  
Ph. D. in Biological Sciences, Ass. Professor of the Dpt. of Biology  
Bryansk State University named after Academician I. G. Petrovsky, Bryansk  
E-mail: elenanemz@mail.ru