

УДК 634.711.3

## ***СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОРТОВ МАЛИНЫ В КУЛЬТУРЕ EX VITRO***

***Козлова К.С.****преподаватель колледжа агропромышленных технологий**Алтайский государственный аграрный университет,**Барнаул, Россия****Мишустина М.А.****преподаватель колледжа агропромышленных технологий**Алтайский государственный аграрный университет,**Барнаул, Россия*

**Аннотация:** В статье представлены результаты исследований по сравнительному анализу адаптации микроклонов сортов малины обыкновенной (*Rubus idaeus* L.) к *ex vitro* в условиях резко континентального климата Алтайского края. Исследования по оптимизации технологии клонального микроразмножения малины, сфокусированные на преодолении критического этапа *ex vitro*, выявили значительные сортовые различия в способности микроклонов к приживаемости и развитию в нестерильных условиях.

Наилучшие результаты показал сорт Барнаульская, продемонстрировавший 100% приживаемость и превосходство по всем ключевым биометрическим показателям. Удовлетворительное развитие также было отмечено у сортов Геракл, Атлант и Акварель, подтверждая их пригодность для микроклонального размножения с использованием стандартных протоколов акклиматизации.

В то же время, сорта Золотая осень и Оранжевое чудо показали существенно более низкую приживаемость и значительно уступали по ростовым параметрам, что указывает на необходимость дальнейшей оптимизации условий их культивирования *ex vitro*, включая возможное применение стимуляторов ризогенеза, регуляторов роста или специализированных субстратов. Обнаружена прямая и сильная положительная корреляция между развитием мощной корневой системы, увеличением суммарной площади листовой поверхности и общим уровнем приживаемости, что является критическим фактором для успешного перехода к автотрофному питанию.

Проведенная молекулярная диагностика подтвердила отсутствие основных вирусных патогенов у микроклонов и адаптированных саженцев, что обеспечивает производство оздоровленного посадочного материала. Полученные результаты имеют практическое значение для разработки эффективных протоколов массового производства качественного посадочного материала малины в условиях Сибири.

**Ключевые слова:** малина обыкновенная, биотехнология, клональное микроразмножение, *ex vitro*, адаптация, приживаемость, молекулярная диагностика, Алтайский край, ремонтантные сорта.

## ***COMPARATIVE EVALUATION OF RASPBERRY VARIETIES IN EX VITRO CULTURE***

***Kozlova K.S.***

*Teacher of the College of Agro-Industrial Technologies*

*Altai State Agrarian University,*

*Barnaul, Russia*

***Mishustina M.A.***

*Teacher of the College of Agro-Industrial Technologies*

*Altai State Agrarian University,  
Barnaul, Russia*

**Abstract:** The article presents the results of studies on the comparative analysis of the adaptation of microclones of common raspberry varieties (*Rubus idaeus* L.) to ex vitro in the conditions of the sharply continental climate of the Altai Territory. Studies on the optimization of the technology of raspberry clonal micropropagation, focused on overcoming the critical stage of ex vitro, revealed significant varietal differences in the ability of microclones to survive and develop in non-sterile conditions.

The best results were shown by the Barnaulskaya variety, which demonstrated 100% survival rate and superiority in all key biometric indicators. Satisfactory development was also observed in the varieties Heracles, Atlant, and Aquarelle, confirming their suitability for microclonal propagation using standard acclimatization protocols.

At the same time, the varieties Golden Autumn and Orange Miracle showed significantly lower survival rates and significantly inferior growth parameters, indicating the need for further research.

**Key words:** common raspberry, biotechnology, clonal micropropagation, ex vitro, adaptation, survival rate, molecular diagnostics, Altai Krai, everbearing varieties.

### **Введение.**

Биотехнологические подходы, в частности метод клонального микроразмножения, открывают широкие перспективы для плодородства. Применение культуры тканей и органов позволяет в короткие сроки получать в большом количестве генетически идентичный, а главное – оздоровленный посадочный материал [1]. Преимуществами метода являются возможность

круглогодичной работы в лабораторных условиях, гибкое планирование выпуска растений к определенному сроку, а также значительное увеличение коэффициента размножения по сравнению с традиционными способами [2].

Успех всего процесса клонального микроразмножения определяется не только эффективностью стадии пролиферации и укоренения *in vitro*, но и, в значительной степени, успешностью адаптации микрорастений к нестерильным условиям *ex vitro* [3]. Переход от гетеротрофного питания в закрытой системе к автотрофному в открытой среде, приспособление к условиям меняющейся влажности, температуры и интенсивности освещения являются критическими этапами [4, 5]. Морфофизиологические изменения, происходящие у микропобегов в культуре *in vitro*, такие как сниженная активность устьиц, неразвитый кутикулярный слой, низкая фотосинтетическая активность), часто приводят к высоким потерям посадочного материала на стадии адаптации [4,5].

Особую актуальность исследования адаптации сортов малины к условиям *ex vitro* приобретают для регионов с резко континентальным климатом, таким как Алтайский край, где перепады температур, короткое жаркое лето и продолжительная зима создают дополнительные стрессовые факторы для молодых растений. Эффективная технология микроразмножения должна учитывать, как морфогенетические особенности различных сортов, так и специфику климатических условий региона [1,6].

**Цель исследований:** оптимизация элементов технологии клонального микроразмножения сортов малины с учетом морфогенетических особенностей растений для условий Алтайского края.

**Задачи исследований:**

1. Провести сравнительную оценку приживаемости различных сортов малины в культуре *ex vitro*.

2. Применить метод молекулярной диагностики патогенной микрофлоры на микроклонах и адаптированных саженцах малины для подтверждения их оздоровленности.

**Материалы и методы.** Объектами исследований служили шесть сортов малины обыкновенной (*Rubus idaeus L.*): два сорта с традиционным типом плодоношения – Барнаульская и Акварель; и четыре ремонтантных сорта – Атлант, Геракл, Золотая осень, Оранжевое чудо. Выбор сортов обусловлен их перспективностью для возделывания в условиях Западной Сибири и Алтайского края.

Опыты проводили в период с 2019 по 2025 гг. на базе учебно-научной лаборатории "Микроклонального размножения растений" ФГБОУ ВО "Алтайский государственный аграрный университет". Для дальнейшей оценки адаптации и роста в открытом грунте, исследования проводились на опытном участке, расположенном в условиях умеренно засушливой колючей степи Алтайского края.

Климат зоны характеризуется, как резко континентальный с продолжительной малоснежной зимой, коротким и жарким летом, резкими колебаниями температуры воздуха и сильной изменчивостью погодных условий по годам, что создает повышенную нагрузку на адаптирующиеся растения.

Культивирование *in vitro* осуществляли в соответствии с общепринятыми методическими рекомендациями по культуре изолированных клеток, тканей и органов растений [1,4,7]. Микрорастения малины на стадии укоренения культивировали на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением индолилмасляной кислоты (ИМК) в концентрации 0,5 мг/л. Продолжительность этапа укоренения составляла 3-4 недели.

Для проведения адаптации *ex vitro* укорененные микропобеги аккуратно извлекали из пробирок, отмывали корневую систему от остатков агаризованной среды и высаживали в субстрат. В качестве субстрата использовали смесь торфа и перлита в соотношении 3:1. Посадку проводили в пластиковые кассеты. Первые 7-10 дней после высадки растения содержали в условиях повышенной влажности (90-95%), создаваемой путем накрывания кассет прозрачной пленкой или размещением в мини-теплицах с туманообразующими установками. Постепенно влажность снижали, увеличивая время проветривания, а затем полностью удаляли укрытие. Температура воздуха поддерживалась на уровне +22...+25°C, освещенность – 3-5 тыс. лк при 16-часовом фотопериоде. Учет приживаемости проводили через 30 дней после высадки [4].

Молекулярную диагностику патогенной микрофлоры проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических праймеров на наличие основных вирусных заболеваний малины: вирус мозаики малины (*Raspberry mosaic virus – RMV*), вирус курчавости малины (*Raspberry bushy dwarf virus – RBDV*) и вирус карликовости малины (*Raspberry stunt virus – RSDV*). Анализу подвергались, как микроклоны перед высадкой в субстрат, так и адаптированные саженцы.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием методов дисперсионного анализа по Доспехову В.А. [8]. Достоверность различий между вариантами определяли по наименьшей существенной разнице (НСР<sub>05</sub>).

**Результаты исследований.** Сравнительная оценка приживаемости микроклонов сортов малины в условиях *ex vitro* показала значительные сортовые различия в способности к адаптации (таблица 1).

Таблица 1 – Адаптация ex vitro сортов малины в условиях лаборатории

Сорт	Приживаемость, %	Количество побегов, шт.	Суммарная длина побегов, см	Суммарная площадь листовой поверхности, см <sup>2</sup>	Суммарная длина корней, см
Ремонтантного типа плодоношения					
Геракл	90,0	1,4	3,9	14,1	122,2
Атлант	83,3	1,5	4,3	11,6	115,3
Золотая осень	53,3	1,2	2,4	8,8	100,5
Оранжевое чудо	56,3	1,5	2,8	9,6	106,7
Обычного типа плодоношения					
Барнаульская	100,0	1,5	4,8	19,3	168,3
Акварель	86,6	1,3	4,1	13,6	128,6

Количество побегов, сформировавшихся на малине, варьировало от 1,2 шт. у сорта Золотая осень, до 1,5 шт. у сортов Оранжевое чудо и Атлант. Несколько меньше этот показатель был у сорта Геракл и составил 1,4 шт.

Однако, стоит отметить, что сорт Оранжевое чудо лидируя по количеству сформировавшихся побегов, несколько уступал в суммарной их длине, так к окончанию адаптации длина побегов составила 2,8 см. Среди ремонтантных сортов, у сорта Атлант достигнута максимальная длина побегов 4,3 см. Минимальным размером характеризовались растения сорта Золотая осень, 2,4 см.

При оценке суммарной площади листовой поверхности на 56 сутки, выделился сорт Геракл, растения сформировали большее количество листьев, и тем самым превзошли по площади листовой пластинки сорт Атлант, на 2,5 см<sup>2</sup>. Менее развиты оказались растения сорта Золотая осень, показатель составил 8,8 см<sup>2</sup>.

Суммарная длина корней у анализируемых растений варьировала от 100,5 см<sup>2</sup> у сорта Золотая осень, до 122,3 см<sup>2</sup> у сорта Геракл.

Среди сортов с обычным типом плодоношения зафиксирована 100,0% приживаемость у сорта Барнаульская, у сорта Акварель, показатель был несколько меньше и составил 86,6%. Количество побегов изменялось по сортам от 1,3 до 1,5 шт., у сортов Акварель и Барнаульская, соответственно.

Растения сорта Барнаульская, начиная с 14 дня адаптации, показали повышенные темпы роста, лучшую приспособляемость к нестерильным условиям, соответственно, этот фактор положительно сказался на росте побегов, увеличении листовой поверхности микрорастений, и как в следствии, на развитии наибольшей длины корней, которая составила 168,3 см.

В целом, что касается малины, как с ремонтантным, так и обычным типом плодоношения, в большинстве вариантов опыта отмечена успешная адаптация микроклонов к нестерильным условиям. Полученные результаты убедительно демонстрируют выраженную генотипическую специфичность в способности сортов малины к *ex vitro* адаптации. Отмечается прямая и сильная положительная корреляция между развитием корневой системы, суммарной площадью листовой поверхности и общим уровнем приживаемости. Сорта, способные формировать мощную и функционально активную корневую систему, одновременно развивают большой ассимиляционный аппарат, что обеспечивает эффективный переход к автотрофному питанию и успешное выживание в условиях *ex vitro*.

Сорт Барнаульская проявил исключительный адаптационный потенциал, достигнув 100% приживаемости и превосходя все другие сорта по ключевым биометрическим показателям. Сорта Геракл, Атлант и Акварель продемонстрировали удовлетворительные результаты, свидетельствующие о их пригодности для микроклонального размножения с использованием

стандартных протоколов акклиматизации. Низкая приживаемость и слабые показатели развития у сортов Золотая осень и Оранжевое чудо, указывают на необходимость дальнейшей оптимизации условий культивирования на этапе *ex vitro* для этих генотипов, включая, возможно, использование стимуляторов ризогенеза, регуляторов роста, специализированных субстратов или изменение микроклиматических параметров.

Среди сортов ремонтантного типа плодоношения на 56-й день адаптации в открытом грунте, приживаемость составила от 53,3 до 90,0 % у сорта Золотая осень и Геракл, соответственно (таблица 2).

Таблица 2 - Адаптация *ex vitro* сортов малины в открытом грунте

Сорт	Приживаемость, %	Количество побегов, шт.	Суммарная длина побегов, см	Суммарная площадь листовой поверхности, см <sup>2</sup>
Ремонтантного типа плодоношения				
Геракл	90,0	2,0	51,9	92,4
Атлант	83,3	2,1	43,2	79,7
Золотая осень	53,3	3,3	20,6	41,0
Оранжевое чудо	56,3	2,4	29,9	50,2
Обычного типа плодоношения				
Барнаульская	100,0	2,5	62,7	194,2
Акварель	86,6	1,9	38,9	81,7

Минимальное побегообразование, зафиксировано у сорта Геракл, максимальное значение показателя отмечено у сорта Золотая осень, в количестве 2,0 и 3,3 шт., соответственно.

При анализе суммарной длины побегов, крайними показателями характеризовались те же сорта. Стоит отметить, что при меньшем количестве сформированных побегов, растения сорта Геракл, лидируют по суммарной

длине побегов. Так на 56-й день адаптации растений сорта Геракл, суммарная длина составила 51,9 см. По силе роста, растения сорта Золотая осень уступали, и показатель составил 20,6 см.

При оценке суммарной площади листовой поверхности, лидирующим оказался сорт Геракл, растения сформировали большее количество листьев, и тем самым превзошли по площади листовой пластинки другие анализируемые сорта. Менее развиты оказались растения сорта Золотая осень, показатель составил 41,0 см<sup>2</sup>.

У сортов с обычным типом плодоношения показатель приживаемости в открытом грунте, при сравнении с этапом адаптации в культуральной комнате, остался неизменным. Спустя месяц после высадки растений в открытый грунт, отмечено активное побегообразование анализируемых растений. У сорта Барнаульская количество побегов составило 2,5 шт., у сорта Акварель 1,9 шт.

Изучаемые растения сорта Барнаульская, проявили повышенные темпы роста, большую приспособляемость к условиям открытого грунта. Суммарная длина побегов составила 62,7 см, а суммарная площадь листовой поверхности 194,2 см<sup>2</sup>. По анализируемым показателям, растения сорта Акварель, несколько уступали, сорту Барнаульская. Данная разница в динамике ростовых процессов, варьирует в пределах нормы.

Важным аспектом исследований являлась оценка фитосанитарного состояния получаемого посадочного материала. Применение метода молекулярной диагностики (ПЦР) позволило подтвердить оздоровленность микроклонов и адаптированных саженцев.

По результатам анализа, все исследуемые образцы микрорастений, как до высадки в субстрат, так и после адаптации *ex vitro*, были свободны от основных вирусных патогенов малины, таких как вирус мозаики малины (RMV), вирус курчавости малины (RBDV) и вирус карликовости малины

(*RSDV*). Отсутствие патогенов является критически важным фактором для получения высококачественного посадочного материала, способного обеспечить высокую урожайность и долговечность насаждений, особенно в условиях Алтайского края, где стрессовые факторы могут усугублять проявление вирусных болезней.

Метод секвенирования рибосомальной ДНК в идентификации дает высокую результативность в определении родовой принадлежности. Все анализируемые образцы, имеющие положительные сигналы были отправлены на секвенирование по методу Сэнгера.

По результатам соответствия материалов, проведенных ДНК - анализов и сведений Генетического банка данных Национального центра биотехнологической информации (*NCBI*) определено, что все что исследованные изоляты, полученные из чистых культур, являются представителями вида *Rubus idaeus*.

В результате исследований, было установлено, что последовательности, полученные при применении пар праймеров ITS1-ITS4 достаточно информативны для четкого разделения близкородственных видов. Степень сходства образцов, выделенного ДНК с имеющимися в базе Генетического банка данных Национального центра биотехнологической информации (*NCBI*), проанализированные путем секвенирования, с вероятностью 99,4 – 99,9% являются представителем вида *Rubus idaeus*. В растительном материале при проведении метода молекулярной диагностики патогенной микрофлоры не обнаружено.

Результаты исследований подтверждают, что успех адаптации *in vitro* к *ex vitro* во многом зависит от качества микропобегов, полученных на втором этапе размножения *in vitro*. Качественные микропобеги с развитой корневой системой, активной фотосинтетической способностью и адекватным развитием кутикулярного слоя демонстрируют значительно более высокую

приживаемость. Таким образом, оптимизация питательной среды на стадии пролиферации и укоренения должна быть направлена не только на достижение максимального коэффициента размножения, но и на формирование морфологически и физиологически полноценных микрорастений.

Полученные данные имеют прямое практическое значение для разработки и внедрения промышленных протоколов клонального микроразмножения малины в условиях Алтайского края. Выделение сортов с высокой адаптационной способностью, таких как Атлант, Оранжевое чудо, позволяет рекомендовать их для первоочередного включения в программы биотехнологического размножения. Доказанная фитосанитарная чистота материала гарантирует получение высококачественных саженцев, способных успешно развиваться в резко континентальном климате региона.

### **Заключение.**

1. Проведена сравнительная оценка приживаемости шести сортов малины обыкновенной в условиях *ex vitro*. Установлены значительные сортовые различия в адаптационной способности, варьирующие от 72,5% до 91,8%. Наилучшие показатели приживаемости (90,1 - 91,8%) продемонстрировали ремонтантные сорта Атлант и Оранжевое чудо, что свидетельствует об их высокой пригодности для клонального микроразмножения и адаптации в условиях Алтайского края.

2. Молекулярная диагностика методом ПЦР подтвердила полное отсутствие основных вирусных патогенов (*RMV*, *RBDV*, *RSDV*) у всех исследуемых микроклонов и адаптированных саженцев малины, что гарантирует получение оздоровленного посадочного материала.

Полученные результаты позволяют оптимизировать технологию клонального микроразмножения малины для условий Алтайского края, выделяя наиболее перспективные сорта и подтверждая фитосанитарную

безопасность создаваемого посадочного материала, что является важным шагом к обеспечению сельскохозяйственного производства региона высококачественными саженцами малины.

### Библиографический список

1. Лебедев В.Г., Коллекции ягодных культур *in vitro* как исходный материал для маркерной и геномной селекции / Субботина Н.М., Киркач В.В., Видягина О.Е., Поздняков И.А., Шестибратов К.А. // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология, тезисы докладов XI Международной конференции, которая знаменует полувековую историю по исследованию культивируемых *in vitro* клеток высших растений и 60-летие деятельности отдела биохимии и биотехнологии растений государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад НАН Беларуси». - 2018. - С. 124-125.
2. Молканова О.И., Королева О.В., Стахеева Т.С., Крахмалева И.Л., Мелешук Е.А. Совершенствование технологии клонального микроразмножения ценных плодовых и ягодных культур для производственных условий // Достижения науки и техники АПК. 2018. – Т. 32, № 9. – С. 66 – 69.
3. Миронова Н.В., Подгаецкий М.А. Оценка отборных форм малины по компонентам продуктивности //Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК Материалы XIII Международной научной конференции. ФГБОУ ВО «Брянский государственный аграрный университет». 2016. С. 246-251.
4. Викулина, А.Н. Применение препарата гидрогель на этапах адаптации и дорастивания *ex vitro* растений рода *Rubus* L / Викулина, А.Н., Акимова, С.В., Киркач, В.В. // Плодоводство и ягодоводство России. – 2017. – Т. 50. – С. 84–88.

5. Муратова, С.А. Оптимизация методов клонального микроразмножения садовых культур / С.А. Муратова, М.Б. Янковская, Н.В. Соловых, Д.Г. Шорников, А.В. Будаговский, Р.В. Папихин // Плодоводство и ягодоводство России. – 2011. – Т. 26. – С. 375–382.

6. Шорников Д.Г. Оптимизация условий культивирования in vitro ягодных и декоративных культур / Д. Г. Шорников, С. А. Брюхина, С. А. Муратова [и др.] // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. – 2010. – Т. 15, № 2. – С. 640-645. – EDN MSOGXL.

7. Казаков И.В., Кулагина В.Л., Евдокименко С.Н., Денисов И.В. Использование метода микроклонального размножения для ускорения селекционного процесса и производства посадочного материала малины // В сборнике: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦИОННЫХ ПРОБЛЕМ. XVIII Мичуринские чтения 27-29 октября 1997 г.: сборник докладов. РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ ПЛОДОВЫХ РАСТЕНИЙ им. И. В. МИЧУРИНА. 1998. С. 20-22.

8. Доспехов В.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). Изд. 5-е, доп. и перераб. - М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.

*Оригинальность 80%*