ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-67-76
УДК 634.739.2

Оригинальная статья
http://fptt.ru

Особенности клонального микроразмножения клюквы болотной (*Oxycoccus palustris* Pers.)

С. С. Макаров[1,*], И. Б. Кузнецова[2], М. Т. Упадышев[3], С. А. Родин[4], А. И. Чудецкий[1]

[1] Центрально-европейская лесная опытная станция, Кострома, Россия

[2] Костромская государственная сельскохозяйственная академия, Караваево, Россия

[3] Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, Москва, Россия

[4] Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства, Пушкино, Россия

Дата поступления в редакцию: 18.01.2021 *Дата принятия в печать: 15.02.2021*

**e-mail: makarov_serg44@mail.ru*
© С. С. Макаров, И. Б. Кузнецова, М. Т. Упадышев, С. А. Родин, А. И. Чудецкий, 2021

Аннотация.
Введение. В последнее десятилетие среди потребителей недревесной продукции леса сильно возрос спрос на посадочный материал клюквы болотной (*Oxyccocus palustris* Pers.), которая обладает высокой пищевой и лекарственной ценностью. Для плантационного выращивания клюквы болотной оздоровленным посадочным материалом целесообразно применение метода клонального микроразмножения. Цель исследования – изучение влияния различных росторегулирующих веществ и их концентраций на всех этапах клонального микроразмножения клюквы болотной *in vitro* на биометрические показатели растений и приживаемость в нестерильных условиях *in vivo*.
Объекты и методы исследования. Растения клюквы болотной сорта «Дар Костромы» и гибридной формы 1-15-635. Использовали различные препараты и регуляторы роста, влияющие на биометрические показатели растений и приживаемость к нестерильным условиям *in vivo* на всех этапах клонального микроразмножения растений.
Результаты и их обсуждение. На этапе введения в культуру *in vitro* высокая жизнеспособность эксплантов клюквы болотной сорта «Дар Костромы» и гибридной формы 1-15-635 установлена при обработке $AgNO_3$ (95–96 %), препаратом Лизоформин 3000 (5 %) при экспозиции 10 мин, а также раствором препарата экостерилизатор 5 % в соотношении 1:1 при экспозиции 20 мин (90–95 %). На этапе «собственно микроразмножение» при возрастании в питательной среде WPM 1/4 концентрации цитокинина 2ip от 1,0 до 5,0 мг/л увеличивались количество, средняя длина и суммарный прирост побегов. На этапе укоренения *in vitro* максимальные значения количества, средней длины и суммарного прироста корней у растений-регенерантов клюквы болотной обоих сортов отмечены при добавлении в питательную среду препарата Корнерост в концентрации 5,0 мг/л. На этапе адаптации растений клюквы болотной к условиям *in vivo* максимальная приживаемость (94–100 %) отмечена в варианте с добавлением препарата Микогель в концентрации 0,2 мг/л.
Выводы. Различные росторегулирующие вещества и их концентрации оказывают влияние на биометрические показатели клюквы болотной (*Oxycoccus palustris* Pers.) и ее приживаемость в нестерильных условиях *in vivo* на всех этапах клонального микроразмножения растения *in vitro*.

Ключевые слова. Клюква болотная, клональное микроразмножение, *in vitro*, *in vivo*, стерилизующий раствор, адаптация

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания «Проведение прикладных научных исследований» Федерального агентства лесного хозяйства России (Рослесхоз) (№ 1061).

Для цитирования: Особенности клонального микроразмножения клюквы болотной (*Oxycoccus palustris* Pers.) / С. С. Макаров, И. Б. Кузнецова, М. Т. Упадышев [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2021. – Т. 51, № 1. – С. 67–76. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-67-76.

Original article

Available online at http://fptt.ru/eng

Clonal Micropropagation of Cranberry (*Oxycoccus palustris* Pers.)

Sergey S. Makarov[1,*], Irina B. Kuznetsova[2], Mikhail T. Upadyshev[3], Sergey A. Rodin[4], Anton I. Chudetsky[1]

[1] Central European Forest Experimental Station, Kostroma, Russia

[2] Kostroma State Agricultural Academy, Karavaevo, Russia

[3] Federal Horticultural Research Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow, Russia

[4] All-Russian Scientific Research Institute of Silviculture and Mechanization of Forestry, Pushkino, Russia

Received: January 18, 2021 *Accepted: February 15, 2021*

**e-mail: makarov_serg44@mail.ru*
© S.S. Makarov, I.B. Kuznetsova, M.T. Upadyshev, S.A. Rodin, A.I. Chudetsky, 2021

Abstract.
Introduction. The last decade saw a considerable increase in the demand for European cranberry planting material (*Oxyccocus palustris* Pers.) among consumers of non-timber forest products. Cranberry possesses high nutritional and medicinal value. Cultivars and hybrids of European cranberry prove extremely productive for plantation growth using the method of clonal micropropagation with revitalized planting material.
Study objects and methods. The research featured European cranberry plants of the Dar Kostromy cultivar and its hybrid form 1-15-635. The study focused on the effect of various medications and growth regulators on the biometric profile of European cranberry and its adaptation to non-sterile conditions at all stages of *in vivo* clonal micropropagation.
Results and discussion. During the introduction stage, the highest viability belonged to the explants treated with $AgNO_3$ (95–96%) and Lizoformin 3000 (5%) as the main sterilizing solutions at a 10-min exposure and a 5% solution of Ecosterilizer (1:1) at a 20-min exposure (90–95%). During the micropropagation proper, the number, average length, and total growth of shoots increased as the concentration of cytokinin 2ip in the WPM 1/4 nutrient medium rose from 1.0 to 5.0 mg/L. At the stage of *in vitro* rooting, the maximal number, average length, and total growth of roots in regenerated plants for both cultivars were observed when Kornerost 5.0 mg/L was added to the WPM 1/4 nutrient medium. At the stage of adaptation to *in vivo* conditions, Micogel 0.2 mg/L contributed to the highest survival rate (94–100%).
Conclusion. During clonal micropropagation *in vitro*, the biometric profile of European cranberry (*Oxyccocus palustris* Pers.) and its survival rate under non-sterile conditions *in vivo* proved to depend on various growth-regulating substances and their concentrations.

Keywords. European cranberry, clonal micropropagation, *in vitro*, *in vivo*, sterilizing solution, adaptation

Funding. The research was part of the State Task “Conducting Applied Scientific Research” of the Federal Forestry Agency of the Russian (No. 1061).

For citation: Makarov SS, Kuznetsova IB, Upadyshev MT, Rodin SA, Chudetsky AI. Clonal Micropropagation of Cranberry (*Oxycoccus palustris* Pers.). Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(1):67–76. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-1-67-76.

Введение

На сегодняшний день одним из актуальных и перспективных направлений лесного хозяйства, связанного с принципом многоцелевого, рационального, непрерывного и неистощительного лесопользования, является заготовка недревесных ресурсов леса для удовлетворения потребностей общества в них. Однако вмешательство антропогенных факторов в природные процессы стремительно сокращает запасы ягод клюквы, брусники, черники и др., а также снижает качество грибных угодий. В связи с увеличением площадей неиспользуемых лесных земель, нарушенных промышленными разработками, в том числе осушенных и выработанных торфяных месторождений, остается актуальным вопрос их рекультивации. Его можно разрешить с помощью создания плантаций лесных ягодных растений, произрастающих на болотных почвах. Также создание плантаций лесных ягодных растений на выработанных торфяниках позволит повысить эффективность работы сельскохозяйственной и лесной отрасли, обеспечивая рентабельность использования побочной продукции леса [1].

За последнее десятилетие среди потребителей и заготовителей недревесной продукции леса, в частности лесных ягодных растений, сильно возрос интерес и спрос на посадочный материал клюквы болотной (*Oxyccocus palustris* Pers.), связанный с высокой морозоустойчивостью, продуктивностью и продолжительностью жизни данного вида. По сравнению с клюквой крупноплодной (*Oxyccocus macrocarpus* (Ait.) Pers.) клюква болотная менее урожайна, сильнее угнетается сорными растениями и сложнее поддается механизированной уборке урожая ягод. Однако в таежной зоне европейской России клюква болотная, в силу невысокой потребности в тепле, более перспективна для культивирования, чем клюква крупноплодная. Различными исследованиями установлено, что при выращивании на плантациях она показывает высокий процент урожая, чем в естественных зарослях. Кроме того, выращивание

высокопродуктивных сортов и гибридов клюквы болотной способствует повышению урожайности плантаций данной ягодной культуры [2].

Благодаря уникальному химическому составу клюква обладает высокой пищевой и лекарственной ценностью. Плоды клюквы содержат сахара, органические кислоты, бензойную и хлорогеновую кислоты, пектиновые вещества, витамины (С, B_1, B_2, B_5, B_6, PP, K_1), макро- и микроэлементы (калий, фосфор, кальций, железо, марганец, медь, молибден, магний, йод, бор, барий, кобальт, цинк, серебро, алюминий и др.), а также бетаин и биофлавоноиды (антоцианы, лейкоантоцианы, катехины, флавонолы, фенолокислоты) [3–5]. Плоды клюквы широко используются в пищевой промышленности и народной домашней кулинарии как в сыром, так и переработанном виде. Наиболее популярны соки, морсы, кисели, настойки, соусы, добавки в консервированные заготовки и квашеные продукты, а также множество других способов приготовления. Экстракт ягод обладает разнообразными профилактическими и лечебными свойствами. Он оказывает антисептическое, гипотензивное, противовоспалительное, антисклеротическое и противоцинготное действие. Влияет на водно-солевой обмен, стимулирует деятельность поджелудочной железы и проявление гемостатического эффекта. Способствует повышению уровня гемоглобина, поддержанию работы сердца, повышению эластичности стенок сосудов. Экстракт ягод клюквы может успешно применяться при простудных заболеваниях, ангине, ревматизме, цинге, малокровии, почечнокаменной болезни, повышенном кровяном давлении, заболеваниях мочевого пузыря и мочевыводящих путей, заболеваниях желудка и печени, гипо- и авитаминозе С, кожных заболеваниях и др., а также в качестве антипаразитарного средства. Клюква тонизирует, освежает, придает бодрость, повышает умственную и физическую трудоспособность, а содержащиеся в ягодах клюквы пектиновые вещества обладают способностью связывать и обезвреживать соединения свинца, кобальта, цезия, стронция и других тяжелых металлов и их радиоактивных изотопов [6–10].

Плантационное выращивание лесных ягодных растений на неиспользуемых лесных и нелесных землях требует большого количества высококачественного посадочного материала. Удовлетворить данные потребности можно путем разработки перспективных способов получения посадочного материала, учитывающих биологические особенности лесных ягодных растений и обеспечивающих высокую эффективность их размножения. Поскольку существующие традиционные способы размножения не всегда обеспечивают стабильность результатов, трудозатратны и не находят широкого применения, то необходимо использовать экономически успешный способ размножения растений: клональное микроразмножение. Этот способ размножения осуществляют на искусственных питательных средах в культуре *in vitro*. Основными достоинствами данного метода являются высокий коэффициент размножения и возможность получения заданного количества высококачественного и здорового посадочного материала вне сезонности в условиях небольшой по площади лаборатории [11].

Отечественными и зарубежными авторами исследовались особенности клонального микроразмножения клюквы крупноплодной, в частности методами активации пазушных меристем и индукции адвентивных почек тканями эксплантa, с использованием регуляторов роста цитокининовой (2ip, кинетин, зеатин) и ауксиновой (ИУК, ИМК) групп [12–14]. Однако в России до сих пор мало уделяется должного внимания культуре *in vitro* высших растений [15].

Цель исследования – изучение влияния различных росторегулирующих веществ и их концентраций на всех этапах клонального микроразмножения клюквы болотной *in vitro* на биометрические показатели растений и приживаемость в нестерильных условиях *in vivo*.

Объекты и методы исследования

Исследование проводилось в лаборатории клонального микроразмножения растений на базе филиала ФБУ ВНИИЛМ «Центрально-европейская лесная опытная станция» в 2019–2020 гг. по общепринятым методикам, адаптированным к местным условиям произрастания [11]. Объектами исследований служили растения клюквы болотной сорта «Дар Костромы» и гибридной формы 1-15-635, отобранные на опытных участках на месте выработанных месторождений торфа переходного типа в Костромском районе Костромской области.

Сорт «Дар Костромы» получен на Костромской лесной опытной станции ВНИИЛМ в результате селекционной работы, направленной на создание сверхранних и хорошо адаптированных к климатическим условиям российского Нечерноземья сортов, путем отбора из массового посева семян клюквы болотной из природных популяций данного вида в Рязанской области. Сорт среднего срока созревания. Представляет собой вегетативно-подвижный кустарничек шпалерного типа. Стелющийся побег имеет бурую окраску, среднюю облиственность, волосистое опушение; приподнимающийся побег средней длины характеризуется промежуточным типом роста, красно-коричневой окраской, средней облиственностью, волосистым опушением. Лист

стелющегося и приподнимающегося побега длинный, средней ширины, широко-ланцетной формы зеленой окраски. Цветковая почка крупная, на побеге – одна (верхушечная). Плод (ягода) крупного размера (12,5×16,5 мм) плоскоокруглой формы с ребристой поверхностью. Средняя масса ягоды 1,5–1,6 г. Сорт средне самоплодный. Плодоношение начинается на 3 год после посадки черенков. На 4 год отмечается возрастание урожая ягод. С 5 года после посадки черенков ежегодно отмечается присущий сорту урожай с небольшими колебаниями по годам. В пору плодоношения урожайность высокая (1,6–1,9 кг/м^2). Период товарного плодоношения продолжительный. Сорт среднего срока цветения и созревания ягод. В условиях Центрально-европейской части России, в частности в южно-таежном лесной районе Европейской части России (Костромская область), начало цветения отмечено в начале первой декады июня, а ягоды полностью созревают в первой декаде сентября. Сорт малозимостойкий в бесснежный период, высокозимостойкий под снегом или при вмораживании заросли в лед; слабо устойчив к снежной плесени без вмораживания. Устойчив к вредителям (вересковый листоед, античная волнянка, пятнистая волнянка). К достоинствам сорта относятся крупноплодность и высокий уровень урожайности. Недостатками данного сорта являются формирование большей части урожая внутри заросли и неодномерность ягод.

Крупноплодная и высокоурожайная гибридная форма 1-15-635 отобрана из гибридной семьи ♀15V×♂Virussaare на Центрально-европейской лесной опытной станции ВНИИЛМ. Материнская форма 15V отобрана из естественной популяции (клюквенное болото Южной Карелии) сотрудниками Института биологии Карельского научного центра по принципу исключительной крупноплодности. Отцовский высокоурожайный сорт Virussaare создан в Эстонии. Форма среднеспелая, очень быстро начинает плодоносить. Средняя масса одной ягоды 1,36–1,89 г. Ягоды крупные (до 3,09–3,26 г), округлые, темно-красные. Средняя урожайность 1,5–2,0 кг/м^2.

Процесс клонального микроразмножения состоит из 4 этапов:

– введение в культуру *in vitro* включает в себя выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение стерильной культуры;

– «собственно микроразмножение» включает обычно 3–4 пассажа на питательную среду с добавлением регуляторов роста цитокининовой группы с целью получения нужного количества растений-регенерантов;

– укоренение *in vitro* подразумевает укоренение размноженных побегов на питательной среде с добавлением регуляторов роста ауксиновой группы;

– адаптация к условиям *in vivo*, а затем к почвенным условиям: выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к высадке в открытый грунт [11].

На этапе введения в культуру *in vitro* изучали влияние различных стерилизующих растворов и экспозиции обработки на жизнеспособность эксплантов клюквы болотной. В качестве эксплантов использовали одревесневшие черенки с двумя почками. Очищенные и промытые черенки клюквы болотной на 0,5 мин помещали в стакан с 70 % спиртом, после этого промывали в 5 порциях стерильной дистиллированной воды. В качестве основных стерилизаторов использовали растворы сулемы (0,2 %), азотнокислого серебра $AgNO_3$ (0,2 %), экостерилизатора бесхлорного 5 % (в соотношении 1:1), хлорной извести (в соотношении 1:1), препарата Лизоформин 3000 (5 %). Время экспозиции 5, 10, 15 и 20 мин. В каждом варианте опыта по 100 эксплантов. Учитывали жизнеспособность эксплантов по соотношению живых эксплантов к общему количеству введенных в культуру на питательную среду с минеральной основой WPM, разбавленной в 4 раза.

Далее растения-регенеранты клюквы болотной культивировали на питательной среде WPM, разбавленной в 4 раза, в условиях световой комнаты при температуре воздуха +23–25 °С, относительной влажности 75–80 % и фотопериоде 16/8 часов. На этапе «собственно микроразмножение» изучали влияние различных концентраций (1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 и 6,0 мг/л) регулятора роста цитокининовой группы 2ip в питательной среде на биометрические показатели растений-регенерантов клюквы болотной. Повторность опыта 3-х кратная, по 10 микрорастений в каждом варианте. Учитывали количество, среднюю длину и суммарный прирост микропобегов у исследуемых растений-регенерантов.

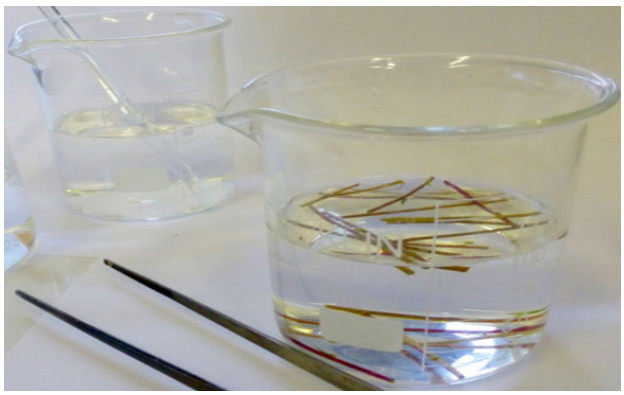


Рисунок 1. Процесс стерилизации эксплантов клюквы болотной для введения в культуру *in vitro*

Figure 1. Sterilization of European cranberry explants to be introduced into *in vitro* culture

Таблица 1. Жизнеспособность эксплантов (%) клюквы болотной в зависимости от стерилизующих агентов и времени экспозиции

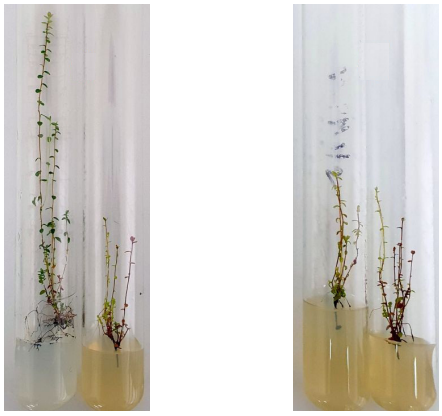
Table 1. Viability of explants (%) of European cranberry, depending on sterilizing agents and exposure time

Время экспозиции, мин	Стерилизующий агент				
	Сулема 0,2 %	$AgNO_3$ 0,2 %	Экостерилизатор бесхлорный 5 % 1:1	Хлорная известь 1:1	Лизоформин 3000 5 %
Сорт «Дар Костромы»					
5	25	5	5	9	15
10	23	96	72	45	90
15	83	41	54	75	87
20	10	8	95	81	58
Гибридная форма 1-15-635					
5	24	8	6	5	14
10	20	95	42	36	89
15	82	50	62	78	82
20	13	12	90	85	60

На этапе укоренения растений *in vitro* заложили опыт по изучению влияния препарата Корнерост в различных концентрациях (1,0, 2,0, 3,0, 4,0 и 5,0 мг/л) на количество и длину корней клюквы болотной. Использовали также питательную среду WPM, разбавленную в 4 раза. Повторность опыта 3-х кратная, по 10 микрорастений в каждом варианте. Учитывали количество, среднюю длину и суммарный прирост корней растений *in vitro*.

На этапе адаптации к нестерильным условиям *in vivo* укорененные растения клюквы в условиях адаптационной комнаты пересаживали на различные субстраты (торф верхового типа; торф переходного типа; торф + песок в соотношении 1:1; кокосовый субстрат), которые предварительно стерилизовали путем пропаривания, потом промачивали растворами исследуемых препаратов в концентрациях 1,0 или 2,0 мг на 10 л воды. Через 7 дней укоренившиеся *in vitro* растения высаживали на субстраты, которые мульчировали мхом сфагнумом. Изучали приживаемость адаптированных растений клюквы болотной в зависимости от обработки субстратов различными препаратами (хитозановый стимулятор роста растений «Слокс Эко Артемия» и препараты микоризного типа – Микогель, Микориза, Биомикориза).

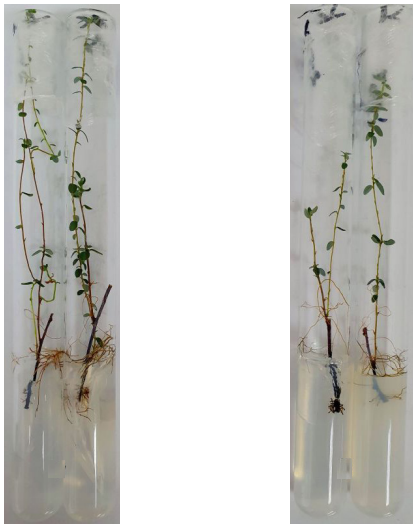
Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения AGROS v.2.11 и пакета Microsoft Office 2016. Наименьшую



(a) (b)

Рисунок 2. Образование микропобегов растений клюквы болотной *in vitro* при добавлении цитокинина 2ip: a – сорт «Дар Костромы»; b – гибридная форма 1-15-635

Figure 2. Microshoots of European cranberry plants *in vitro* after adding cytokinin 2ip: a – Dar Kostromy; b – hybrid 1-15-635



(a) (b)

Рисунок 3. Корнеобразование растений клюквы болотной *in vitro* при добавлении препарата Корнерост: a – сорт «Дар Костромы»; b – гибридная форма 1-15-635

Figure 3. Roots of European cranberry plants *in vitro* after adding Kornerost: a – Dar Kostromy; b – hybrid 1-15-635

Таблица 2. Влияние концентрации цитокинина 2ip на биометрические показатели одного растения клюквы болотной *in vitro*

Table 2. Effect of cytokinin 2ip concentration on the biometric profile of one European cranberry plant *in vitro*

Концентрация цитокинина 2ip, мг/л	Биометрические показатели		
	Количество побегов, шт.	Средняя длина побегов, см	Суммарный прирост побегов, см
Сорт «Дар Костромы»			
1,0	3,8 ± 0,2	10,8 ± 0,9	41,5 ± 3,3
2,0	4,1 ± 0,1	11,1 ± 1,0	46,5 ± 2,5
3,0	4,9 ± 0,3	12,3 ± 1,2	60,2 ± 3,6
4,0	5,9 ± 0,2	12,9 ± 1,2	76,1 ± 2,8
5,0	8,8 ± 0,5	14,5 ± 1,5	127,6 ± 2,4
6,0	7,8 ± 0,4	13,7 ± 1,3	106,9 ± 3,9
$НСР_{05}$	0,58	1,15	2,09
Гибридная форма 1-15-635			
1,0	4,0 ± 0,2	11,2 ± 0,8	44,8 ± 2,3
2,0	4,5 ± 0,3	11,6 ± 1,1	52,2 ± 3,4
3,0	5,9 ± 0,3	12,2 ± 1,2	72,6 ± 2,6
4,0	7,6 ± 0,2	13,5 ± 1,2	102,6 ± 2,9
5,0	9,2 ± 0,5	15,1 ± 1,5	140,2 ± 2,5
6,0	8,1 ± 0,4	14,3 ± 1,2	116,3 ± 2,1
$НСР_{05}$	0,64	1,21	2,21

существенную разницу ($НСР_{05}$) рассчитывали по общепринятой методике дисперсионного анализа.

Результаты и их обсуждение

Проведенные наблюдения показали, что на этапе введения в культуру *in vitro* оптимальная экспозиция обработки эксплантов зависит от стерилизующего раствора (рис. 1).

Высокая жизнеспособность эксплантов у сорта «Дар Костромы» и гибридной формы 1-15-635 установлена при стерилизации азотнокислым серебром $AgNO_3$ 0,2 % (95–96 %) и препаратом Лизоформин 3000 5 % (89–90%) при экспозиции 10 мин. При использовании раствора сулемы 0,2 % при экспозиции 15 мин жизнеспособность составила 82–83 %, а в вариантах обработки растворами препарата экостерилизатора бесхлорного 5 % (в соотношении 1:1) и хлорной извести (в соотношении 1:1) при экспозиции 20 мин – 90–95 и 81–85 % соответственно (табл. 1).

На этапе «собственно микроразмножение» установлено, что при возрастании концентрации цитокинина 2ip от 1,0 до 5,0 мг/л в питательной среде WPM, разбавленной в 4 раза, увеличивались количество, средняя длина и суммарный

Таблица 3. Влияние препарата Корнерост на биометрические показатели одного растения клюквы болотной *in vitro*

Table 3. Effect of Kornerost on the biometric profile of one European cranberry plant *in vitro*

Концентрация препарата Корнерост, мг/л	Биометрические показатели		
	Количество корней, шт.	Средняя длина корней, см	Суммарный прирост корней, см
Сорт «Дар Костромы»			
1,0	4,0 ± 0,2	6,1 ± 0,4	24,5 ± 1,4
2,0	4,5 ± 0,2	6,9 ± 0,9	31,1 ± 1,8
3,0	5,2 ± 0,3	7,2 ± 0,6	37,5 ± 1,9
4,0	5,6 ± 0,3	8,2 ± 0,2	46,2 ± 1,0
5,0	6,3 ± 0,2	9,2 ± 0,5	58,6 ± 1,1
$НСР_{05}$	0,74	0,83	2,30
Гибридная форма 1-15-635			
1,0	4,2 ± 0,2	6,2 ± 0,4	26,4 ± 1,3
2,0	4,7 ± 0,2	7,0 ± 0,6	32,9 ± 1,9
3,0	5,8 ± 0,3	7,3 ± 0,8	42,4 ± 1,8
4,0	5,5 ± 0,3	8,6 ± 0,4	47,3 ± 1,0
5,0	6,0 ± 0,2	9,5 ± 0,7	57,3 ± 1,1
$НСР_{05}$	0,76	0,92	2,32

Таблица 4. Приживаемость растений клюквы болотной *in vitro* в нестерильных условиях *in vivo* в зависимости от типа субстрата (%)

Table 4. Survival rate of European cranberry plants *in vitro* under non-sterile conditions *in vivo*, depending on the type of substrate (%)

Вариант субстрата	Сорт	
	Сорт «Дар Костромы»	Гибридная форма 1-15-635
Торф верхового типа	96	92
Торф переходного типа	86	80
Торф + песок 1:1	62	64
Кокосовый субстрат	44	46

прирост побегов исследуемых растений клюквы болотной (рис. 2).

У растений сорта «Дар Костромы» при добавлении регулятора роста цитокининовой группы 2ip в концентрации 5,0 мг/л отмечено максимальное количество побегов (8,8 шт.). Их средняя длина достигала 14,5 см, а суммарный прирост – 127,6 см на одно растение; у перспективной гибридной формы 1-15-635 – 9,2 шт., 15,1 и 140,2 см соответственно. Различия статистически значимы. Однако при дальнейшем увеличении концентрации цитокинина 2ip до 6,0 мг/л наметилась тенденция к существенному снижению этих показателей (табл. 2).

На этапе «укоренение *in vitro*» выявлено, что количество, средняя длина и суммарный прирост корней у растений-регенерантов клюквы болотной увеличивались с повышением в питательной среде WPM, разбавленной в 4 раза, концентрации препарата Корнерост (рис. 3).

Отмечено, что они достигли максимальных значений при добавлении в питательную среду препарата Корнерост в концентрации 5,0 мг/л. В этом варианте у сорта «Дар Костромы» количество корней составляло 6,3 шт., их средняя длина – 9,2 см,

Рисунок 4. Растения клюквы болотной *in vitro*, адаптированные к условиям *in vivo* на субстрате из верхового торфа

Figure 4. European cranberry plants *in vitro* adapted to *in vivo* conditions in a high-moor peat substrate

Таблица 5. Влияние обработки субстрата различными препаратами на приживаемость (%) клюквы болотной в нестерильных условиях *in vivo*

Table 5. Effect of various medications on the survival rate (%) of marsh cranberries in non-sterile conditions *in vivo*

Вариант	Концентрация препарата, мг/л	
	0,1	0,2
Сорт «Дар Костромы»		
Вода (контроль)	48	
Слокс Эко Артемия	58	78
Микогель	86	94
Микориза	66	70
Биомикориза	68	78
Гибридная форма 1-15-635		
Вода (контроль)	50	
Слокс Эко Артемия	60	76
Микогель	90	100
Микориза	70	78
Биомикориза	90	92

суммарный прирост – 58,6 см; а у гибридной формы 1-15-635 – 6 шт., 9,5 и 57,3 см соответственно (табл. 3).

Для адаптации клюквы болотной *in vitro* к нестерильным условиям *in vivo* растения пересадили на различные субстраты из верхового торфа. Приживаемость различных сортов клюквы болотной, в зависимости от типа субстрата, приведена в таблице 4.

Наилучшие показатели приживаемости растений клюквы болотной обоих сортов были выявлены на субстрате из верхового торфа и составили 92–96 % (рис. 4).

Далее исследования проводили на субстрате из верхового торфа, показавшем лучшие результаты. Обработка торфяного субстрата различными препаратами оказала влияние на приживаемость адаптируемых к нестерильным условиям *in vivo* растений клюквы болотной. В контрольном варианте, где субстрат промачивали чистой водой, приживаемость оказалась самой низкой и составила 48–50 % (табл. 5).

В вариантах с использованием каждого из препаратов в концентрации 0,2 мг/л приживаемость адаптируемых растений была выше, чем при внесении их в питательную среду в концентрации 0,1 мг/л. Самая высокая приживаемость растений наблюдалась в вариантах с добавлением в субстрат из верхового торфа, содержащего микоризу, препарата Микогель в концентрации 0,2 мг/л и достигала: у сорта «Дар Костромы» – 94 %, у гибридной формы 1-15-635 – 100 %.

Выводы

При проведении исследований установлены следующие результаты.

При клональном микроразмножении клюквы болотной на этапе введения в культуру *in vitro* наиболее высокая приживаемость эксплантов (90–96 %) отмечена в вариантах с использованием в качестве основных стерилизующих растворов азотнокислого серебра $AgNO_3$ (0,2 %) и препарата Лизоформин 3000 (5 %) при экспозиции 10 мин, а также препарата экостерилизатор бесхлорный (5 %) в соотношении 1:1 при экспозиции 20 мин;

На этапе «собственно микроразмножение» максимальные показатели по количеству побегов, их средней длине и суммарному приросту у клонируемых растений клюквы болотной сорта «Дар Костромы» и гибридной формы 1-15-635 выявлены при добавлении в питательную среду WPM, разбавленную в 4 раза, цитокинина 2ip в концентрации 5,0 мг/л;

На этапе «укоренение *in vitro*» процесс корнеобразования у растений клюквы болотной обоих сортов наиболее интенсивно проходил при содержании в питательной среде WPM, разбавленной в 4 раза, препарата Корнерост в концентрации 5,0 мг/л;

Приживаемость адаптируемых к условиям *in vivo* растений клюквы болотной оказалась максимальной и достигала 94–100 % при обработке субстрата раствором препарата Микогель в концентрации 0,2 мг/л.

Критерии авторства

С. С. Макаров руководил проектом, проводил закладку лабораторного опыта на этапах введения в культуру *in vitro*, «собственно микроразмножение» и адаптации растений к условиям *in vivo*, проводил анализ литературных источников по вопросу использования биотехнологических методов размножения растений. И. Б. Кузнецова проводила закладку лабораторного опыта на этапах «собственно микроразмножение» и укоренения *in vitro*, проводила статистическую обработку данных. М. Т. Упадышев проводил анализ литературных источников по вопросу пищевой и лекарственной ценности клюквы болотной. С. А. Родин проводил анализ литературных источников по вопросу актуальности использования недревесных ресурсов леса в рамках многоцелевого лесопользования. А. И. Чудецкий проводил закладку лабораторного опыта на этапе адаптации растений к условиям *in vivo*, проводил статистическую обработку данных.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности

Выражаем благодарность канд. с.-х. наук И. А. Кореневу, канд. био. наук Г. Ю. Макеевой, канд. био. наук Г. В. Тяк, канд. с.-х. наук С. Ю. Цареградской, канд. био. наук Л. Е. Курлович, В. А. Макееву, А. В. Тяку.

Contribution

S.S. Makarov supervised the project, performed the laboratory experiments at the stages of introduction, micropropagation proper, and adaptation, and analyzed scientific publications on biotechnological methods in plant propagation. I.B. Kuznetsova participated in the laboratory experiment at the stages of micropropagation proper and rooting *in vitro*, as well as processed statistical data. M.T. Upadyshev analyzed available scientific sources on the nutritional and medicinal value of European cranberries. S.A. Rodin summarized scientific data on non-timber forest resources in multipurpose forest management. A.I. Chudetsky performed the laboratory experiments at the stage of plant adaptation to *in vivo* conditions and processed statistical data.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgments

We express our gratitude to Cand.Sci.(Agri.) I.A. Korenev, Cand.Sci.(Bio.) G.Yu. Makeeva, Cand. Sci.(Bio.) G.V. Tyak, Cand.Sci.(Agri.) S.Yu. Tsaregradskaya, Cand.Sci.(Bio.) L.E. Kurlovich, V.A. Makeev, A.V. Tyak.

Список литературы

1. Проблемы использования и воспроизводства фитогенных пищевых и лекарственных ресурсов леса на землях лесного фонда Костромской области / С. С. Макаров, Е. С. Багаев, С. Ю. Цареградская [и др.] // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. – 2019. – Т. 372, № 6. – С. 118–131. https://doi.org/10.17238/issn0536-1036.2019.6.118.

2. Коренев, И. А. Создание новых сортов лесных ягодных растений и перспективы их интенсивного размножения (*in vitro*) / И. А. Коренев, Г. В. Тяк, С. С. Макаров // Лесохозяйственная информация. – 2019. – № 3. – С. 180–189. https://doi.org/10.24419/LHI.2304-3083.2019.3.15.

3. Comparison of bioactive potential of cranberry fruit and fruit-based products versus leaves / J. Oszmiański, A. Wojdiło, S. Lachowicz [et al.] // Journal of Functional Foods. – 2016. – Vol. 22. – P. 232–242. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.015.

4. Research on the mineral composition of cultivated and wild blueberries and cranberries / A. Karlsons, A. Osvalde, G. Čekstere [et al.] // Agronomy Research. – 2018. – Vol. 16, № 2. – P. 454–463. https://doi.org/10.15159/AR.18.039.

5. How do anthocyanins paint our horticulture products? / K.-D. Gu, C.-K. Wang, D.-G. Hu [et al.] // Scientia Horticulturae. – 2019. – Vol. 249. – P. 257–262. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.034.

6. The antiadhesive activity of cranberry phytocomplex studied by metabolomics: Intestinal PAC-A metabolites but not intact PAC-A are identified as markers in active urines against uropathogenic *Escherichia coli* / G. Peron, S. Sut, A. Pellizzaro [et al.] // Fitoterapia. – 2017. – Vol. 122. – P. 67–75. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.08.014.

7. Debnath, S. C. Antioxidant properties and structured biodiversity in a diverse set of wild cranberry clones / S. C. Debnath, D. An // Heliyon. – 2019. – Vol. 5, № 4. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01493.

8. Philip, N. Cranberry polyphenols: Natural weapons against dental caries / N. Philip, L. J. Walsh // Dentistry Journal. – 2019. – Vol. 7, № 1. https://doi.org/10.3390/dj7010020.

9. Effects of blueberry and cranberry consumption on type 2 diabetes glycemic control: A systematic review / D. M. U. P. Rocha, A. P. S. Caldas, B. P. da Silva [et al.] // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2019. – Vol. 59, № 11. – P. 1816–1828. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1430019.

10. Coleman, C. M. Oligosaccharides and complex carbohydrates: A new paradigm for cranberry bioactivity / C. M. Coleman, D. Ferreira // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 4. https://doi.org/10.3390/molecules25040881.

11. Мацнева, О. В. Клональное микроразмножение земляники – перспективный метод современного питомниководства (обзор) / О. В. Мацнева, Л. В. Ташматова // Современное садоводство. – 2019. – № 4. – С. 113–119. https://doi.org/10.24411/2312-6701-2019-10411.

12. Sedlák, J. Micropropagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) through shoot tip cultures – Short communication / J. Sedlák, F. Paprštein // Horticultural Science. – 2011. – Vol. 38, № 4. – P. 159–162. https://doi.org/10.17221/115/2010-HORTSCI.

13. Litwińczuk, W. Micropropagation of *Vaccinium* sp. by in vitro axillary shoot proliferation / W. Litwińczuk // Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants / M. Lambardi, E. A. Ozudogru, S. M. Jain. – Totowa : Humana Press, 2013. – P. 63–76. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_5.

14. Влияние состава питательных сред и регуляторов роста при клональном микроразмножении некоторых полиплоидных форм рода *Vaccinium* L. / Д. Н. Зонтиков, С. А. Зонтикова, К. В. Малахова [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2019. – Т. 21, № 2 (88). – С. 39–44.

15. Изучение физико-химических свойств и биологической активности экстрактов из высушенной биомассы каллусных, суспензионных клеток и корневых культур *in vitro* / Йонг Янг, Л. К. Асякина, О. О. Бабич [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2020. – Т. 50, № 3. – С. 480–492. DOI: https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-3-480-492.

References

1. Makarov SS, Bagayev ES, Tsaregradskaya SYu, Kuznetsova IB. Problems of use and reproduction of phytogenic food and medicinal forest resources on the forest fund lands of the Kostroma region. Lesnoy Zhurnal (Russian Forestry Journal). 2019;372(6):118–131. (In Russ.). https://doi.org/10.17238/issn0536-1036.2019.6.118.

2. Korenev IA, Tyak GV, Makarov SS. Creation of new varietiesof forest berry plantsand prospects of their intensive reproduction (*in vitro*). Forestry Information. 2019;(3):180–189. (In Russ.). https://doi.org/10.24419/LHI.2304-3083.2019.3.15.

3. Oszmiański J, Wojdiło A, Lachowicz S, Gorzelany J, Matłok N. Comparison of bioactive potential of cranberry fruit and fruit-based products versus leaves. Journal of Functional Foods. 2016;22:232–242. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.015.

4. Karlsons A, Osvalde A, Čekstere G, Ponnale J. Research on the mineral composition of cultivated and wild blueberries and cranberries. Agronomy Research. 2018;16(2):454–463. https://doi.org/10.15159/AR.18.039.

5. Gu K-D, Wang C-K, Hu D-G, Hao Y-J. How do anthocyanins paint our horticulture products? Scientia Horticulturae. 2019;249:257–262. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.034.

6. Peron G, Sut S, Pellizzaro A, Brun P, Voinovich D, Castagliuolo I, et al. The antiadhesive activity of cranberry phytocomplex studied by metabolomics: Intestinal PAC-A metabolites but not intact PAC-A are identified as markers in active urines against uropathogenic *Escherichia coli*. Fitoterapia. 2017;122:67–75. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.08.014.

7. Debnath SC, An D. Antioxidant properties and structured biodiversity in a diverse set of wild cranberry clones. Heliyon. 2019;5(4). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01493.

8. Philip N, Walsh LJ. Cranberry polyphenols: Natural weapons against dental caries. Dentistry Journal. 2019;7(1). https://doi.org/10.3390/dj7010020.

9. Rocha DMUP, Caldas APS, da Silva BP, Hermsdorff HHM, Alfenas RDCG. Effects of blueberry and cranberry consumption on type 2 diabetes glycemic control: A systematic review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019;59(11):1816–1828. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1430019.

10. Coleman CM, Ferreira D. Oligosaccharides and complex carbohydrates: A new paradigm for cranberry bioactivity. Molecules. 2020;25(4). https://doi.org/10.3390/molecules25040881.

11. Matsneva OV, Tashmatova LV. Clonal micro-propagation of strawberries is a promising method of modern nursery practice (review). Contemporary Horticulture. 2019;4:113–119. (In Russ.). https://doi.org/10.24411/2312-6701-2019-10411.

12. Sedlák J, Paprštein F. Micropropagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) through shoot tip cultures – Short communication. Horticultural Science. 2011;38(4):159–162. https://doi.org/10.17221/115/2010-HORTSCI.

13. Litwińczuk W. Micropropagation of *Vaccinium* sp. by in vitro axillary shoot proliferation. In: Lambardi M, Ozudogru EA, Jain SM, editors. Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants. Totowa: Humana Press; 2013. pp. 63–76. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_5.

14. Zontikov DN, Zontikova SA, Malakhova KV, Maramokhin EV. Influence of the composition of nutritional media and growth regulators during clonal micropropagation of some polyliploid forms of the genus *Vaccinium* L. Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. 2019;21(2)(88):39–44. (In Russ.).

15. Yang Y, Asyakina LK, Babich OO, Dyshlyuk LS, Sukhikh SA, Popov AD, et al. Physicochemical properties and biological activity of extracts of dried biomass of callus and suspension cells and *in vitro* root cultures. Food Processing: Techniques and Technology. 2020;50(3):480–492. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-3-480-492.