

УДК 57.085.23:634.10

UDC 57.085.23:634.10

**СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА НОВОГО
ПОКОЛЕНИЯ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ
СТРУКТУРООБРАЗОВАТЕЛИ
ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД.
ЭФФЕКТИВНОСТЬ АДАПТАЦИИ
МИКРОРАСТЕНИЙ ПОДВОЕВ
ЯБЛОНИ EX VITRO**

**GROWTH STIMULATORS OF NEW
GENERATION AND ALTERNATIVE
STRUCTURE'S ORGANIZERS
OF NUTRIENT MEDIUMS.
EFFICIENCY OF ADAPTATION
EX VITRO OF APPLE-TREE
ROOTSTOCKS' MICRO PLANTS**

Беседина Екатерина Николаевна
мл. научный сотрудник

Besedina Ekaterina
Junior Research Associate

Бунцевич Леонид Леонтьевич
канд. биол. наук
зав. лабораторией вирусологии

Buntsevich Leonid
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Virology

*Федеральное Государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт
садоводства и виноградарства»,
Краснодар, Россия*

*Federal State Budget Scientific
Organization «North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture»,
Krasnodar, Russia*

Актуальность работы заключается в решении вопроса снижения себестоимости технологии клонального микроразмножения подвоев яблони при повышении выхода микрорастений. В статье представлены результаты исследований по подбору малотоксичных, экономичных и экологически чистых препаратов ростовых веществ, структурообразователей питательных сред, а также повышению эффективности этапа адаптации микрорастений подвоев яблони к нестерильным условиям среды. По основным показателям качества микропобегов выделился препарат фуrolан в концентрации 4 мг/л, как менее опасный и более экономичный аналог традиционно используемых ростовых веществ (6-БАП, ГК, ИМК), с эффективностью на том же уровне и выше. Аналогом агар-агара в среде с минеральным составом по прописи Мурасиге-Скуга для культивирования подвоев яблони серии СК явился картофельный крахмал. Опытным путем установлены условия, повышающие

The work is relevant because it is directed on a solution of a question of decreasing in prime cost of apple rootstocks' clonal micropropagation technology and increasing exit of plants. The results of researches on selection of the low-toxic, economic and environmentally friendly growth factors, organizers of structure of a nutrient medium, and also increasing of efficiency of apple rootstocks' microplants' adaptation in unsterile environmental conditions are presented. The experiment showed that on the main quality indicators of microshoots furolan in concentration of 4 mg/l is less dangerous and more economic analog of traditionally used growth factors (6-BAP, GA, IBA) with efficiency at the same level and above. The potato starch was defined as analog of agar-agar in the nutrient medium with mineral structure on a recipe of Murashige and Skoog for cultivation apple rootstocks' microshoots of the SK series. By experience the conditions raising the efficiency of apple rootstocks' microplants' adaptation to unsterile

эффективность адаптации микрорастений подвоев яблони к нестерильным условиям среды, в частности, адаптацию микрорастений подвоев яблони следует начинать с момента, когда растения достигнут размера 5-10 см, а их корневая система будет состоять из нескольких хорошо развитых корешков, длиной 2-5 см в 800 мл сосудах на субстрате стабилизированный в течение суток при температуре 100°C выщелоченный чернозём с добавлением половинного раствора солей по прописи Мурасиге-Скуга.

Ключевые слова: ЯБЛОНЯ, СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА, МИКРОПОБЕГИ ПОДВОЕВ, СТРУКТУРООБРАЗОВАТЕЛИ, ЭФФЕКТИВНОСТЬ АДАПТАЦИИ EX VITRO

environmental conditions were established. The adaptation of apple rootstocks' microplants should be begun with the moment when plants reach the size of 5-10 cm, and their root system will consist of several well developed roots, 2-5 cm long in 800 ml vessels on a substratum the lixivious black soil stabilized within a day at a temperature 100 °C with addition of half solution of salts on a recipe of Murashige and Skoog

Key words: APPLE-TREE, GROWTH STIMULATORS, MICRO SHOOTS OF ROOTSTOCKS, ORGANIZERS OF STRUCTURE, EFFICIENCY OF ADAPTATION EX VITRO

Введение. В настоящее время в условиях рыночной экономики актуально снижение себестоимости технологии клонального микроразмножения растений и одновременно повышение выхода микрорастений. Для решения данной проблемы нами был проведён ряд экспериментов по испытанию ростовой активности ранее не использовавшихся в клональном микроразмножении малотоксичных, экологически чистых, экономичных препаратов нового поколения, а также исследование по созданию питательных сред на основе альтернативных структурообразователей. Кроме того, на этапе адаптации к нестерильным условиям среды с целью снижения потерь микрорастений, был заложен ряд опытов по улучшению условий адаптации.

Традиционно используемые в технологии клонального микроразмножения регуляторы роста являются дорогостоящими препаратами: 1 г 6-БАП – 3390,5 р., 1 г ГК – 7773,8 р. по данным сайта Sigma-Aldrich в августе 2015 года [1, 2], а также опасными веществами (ГК умеренно опасна, 6-БАП токсичен). В современных условиях происходит постоянное быстрое

обновление препаратов, также синтезируются новые соединения, обладающие рострегулирующими свойствами, ещё не испытанные при микро-размножении растений. В связи с этим актуальным является испытание и подбор новых, менее опасных, более экономичных препаратов ростовых веществ с эффективностью на уровне контроля (6-БАП, ИМК, ГК) и выше.

Традиционно используемый при микроразмножении агар-агар также является дорогостоящим препаратом: 9625,4 руб./кг по данным сайта Cactrosa в августе 2015 г. [3], поэтому создание питательных сред на основе альтернативных структурообразователей является актуальным исследованием. Повышение эффективности этапа адаптации мериклонов подвоев яблони к нестерильным условиям среды является важным элементом технологии клонального микроразмножения, так как на этапе адаптации к нестерильным условиям гибнет 50-90 % мериклонов [4-9].

Объекты и методы исследований. Исследования выполнены согласно методикам клонального микроразмножения: Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами [7]; Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений [4].

Объектами исследований явились различные химические соединения – компоненты питательных сред, а также приёмы культивирования *in vitro* подвоев яблони СК 2, СК 3, СК 4, СК 7 (селекции СКЗНИИСиб), ММ 106 (селекции Мертон-Моллинской опытной станции). Подвои серии СК были выбраны как перспективные в условиях Северного Кавказа, подвой ММ 106 – высокопродуктивный среднерослый подвой в условиях Северного Кавказа, урожай яблони сорта Голдраш на данном подвое на третий год плодоношения составляет 19,2 т/га при схеме посадки 4x2,5 м. Предметом изучения явилась методика клонального микроразмножения подвоев

яблони. Исследования выполнены в лаборатории биотехнологии СКЗНИИСиВ в 2010-2015 гг. Испытанные в работе стимуляторы роста были созданы в КубГТУ (Краснодар).

В табл. 1 представлена их характеристика.

Таблица 1 – Характеристика химических соединений

№	Шифр или тривиальное название	Состав
1	Л-1	2-метил-2,5-диэтокси-2,5-дигидрофуран
2	I-1	15 % 2-фуранкарбоновой кислоты, 40 % 3-амино-4-гидрокси-2-оксодикарбоновая кислота, 7 % янтарной кислоты, 10 % винной кислоты, 15% яблочной кислоты, 13 % малеиновой кислоты
3	II-2	20 % 2-фуранкарбоновой кислоты 30 % 3-амино-4-гидрокси-2-оксодикарбоновая кислота, 20 % винной кислоты, 15 % яблочной кислоты, 15 % малеиновой кислоты
4	Фуrolан	98,9 %-ный 2-(1,3-диоксоланил-2) -фуран

Данные регуляторы роста являются производными органических кислот, а также препаратами, синтезированными на основе фурфурола, полученного при переработке отходов сельскохозяйственного производства. Выбор в пользу именно этих обладающих ростовой активностью, но ранее не испытанных в технологии клонального микроразмножения препаратов был сделан потому, что они являются малотоксичными, экологически чистыми, экономичными регуляторами роста нового поколения, используемыми в микродозах.

Все вещества добавлялись в среду перед автоклавированием в концентрации 0,4-40 мг/л. В качестве контроля использована стандартная композиция ростовых веществ 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л ГК, 0,1 мг/л ИМК.

Препарат фуrolан – бесцветная жидкость со слабым специфическим ацетальным запахом, содержащая 98,89 % действующего вещества, 2- (1,3-диоксоланил-2) фурана, растворимая в воде и хорошо растворимая в органических растворителях. Фуrolан относится к среднетоксичным со-

единениям ($LD_{50}=511-626$ мг/кг), кумулятивными, кожно-резорбтивными, мутагенными, аллергенными, тератогенными и эмбриотоксическими свойствами не обладает. МДУ препарата в продуктах растительного происхождения 0,05-3 мг/кг, ПДК для воды водоемов – 0,00083 мг/л [10].

Для поддержания нормального роста микропобегов *in vitro* использовали среду МС с полным составом солей. Все регуляторы роста, смеси витаминов добавляли в среды после автоклавирования. В качестве стандартного желирующего агента применяли агар-агар бактериологический. Основным источником углеводного питания на этапе микроразмножения являлась сахароза (20-30 г/л). Культивирование микропобегов осуществляли в условиях стандартного фотопериода 16/8 (день - 16 часов, ночь - 8 часов), освещенности 2500-3000 люкс, температуре $+23\pm 3$ °С и влажности 50-60 %. Каждые 30-40 суток проводили субкультивирование новых побегов на свежую питательную среду.

Обсуждение результатов. Применение стимуляторов роста в технологии клонального микроразмножения подвоев яблони. В первой серии опытов на этапе регенерации микропобегов подвоев яблони было испытано 4 регулятора роста: Л-1, I-1, II-2, фуrolан в концентрации 4-0,4 мг/л. Все вещества добавлялись в среду перед автоклавированием. В качестве стандартного варианта использована композиция ростовых веществ 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ИМК и 0,5 мг/л ГК.

Росторегулирующую активность исследуемых веществ оценивали по следующим показателям: приживаемость эксплантов, число листьев у экспланта, интенсивность окраски листьев (хлороз или здоровая интенсивно зелёная окраска листьев), наличие стебля, число растений, выросших из одной меристемы (коэффициент размножения), наличие каллуса, интенсивность ризогенеза, общее состояние мериклонов по 5-балльной шкале. Результаты испытаний стимуляторов роста в концентрации 0,4 мг/л приведены в табл. 2.

Таблица 2 – Состояние эксплантов (подвои серии СК и ММ106) на средах с различными ростовыми веществами (концентрация 0,4 мг/л) после 3 пассажа

Ростовое вещество	Число листьев на одном экспланте	Коэффициент размножения	Общее состояние микрорастений по 5-балльной шкале	Число растений с интенсивной зелёной окраской листьев, %	Число растений со стеблем, %	Число растений с каллусом у основания микропобега более 4 мм, %	Число растений с корнями, %
Л-1	5,3	3,1	3,6	50	28	3,8	0
I-1	4,6	3,2	4,1	47	42	2,3	0
II-2	4,4	3,2	3,5	41	26	2,9	0
Фуrolан	5,4	3,2	4,2	61	39	2,2	0
6-БАП 1 мг/л + ИМК 0,1 мг/л + ГК 0,5 мг/л (st)	4,8	3,2	3,8	52	36	2,9	0
Без ростовых веществ (контроль)	3,0	1	3,2	35	30	2,9	0
НСР ₀₅	0,8	0,9	0,4	9	6	0,6	

Из табл. 2 видно, что препараты I-1 и фуrolан в концентрации 0,4 мг/л благоприятно влияют на общее состояние эксплантов (4,1 и 4,2 балла соответственно), стандарт – 3,8 баллов (различие между вариантами «фуrolан» и «стандарт» существенно). Среда с препаратом I-1 оказывает наибольший эффект удлинения: доля эксплантов, развивших стебель, составила 42 % (стандарт – 36 %, различие существенно, рис. 1).



Рис. 1. Регенерация микропобегов из эксплантов подвоев серии СК in vitro

По числу развившихся у эксплантов листьев выделились среды с препаратами фуролан (5,4 шт.) и Л-1 (5,3 шт.), стандарт – 4,8 шт., существенного различия со стандартным вариантом не отмечено. Максимальная доля эксплантов со здоровой зелёной окраской листьев образуется на среде с фуроланом (61 %, контроль – 52 %, различие существенно).

Большой каллусообразовательной способностью обладает препарат Л-1: доля мериклонов, регенерировавших каллус у основания побегов, составила 3,8 %, в контрольном и стандартном вариантах – 2,9 %, различие существенно. Установлено, что изученные препараты в концентрации 0,4 мг/л оказывают мультиплицирующее воздействие на растения (коэффициент размножения 3,1-3,2; стандарт – 3,2). Корнеобразующего воздействия на мериклоны у изученных ростовых веществ не выявлено (см. табл. 2).

Способность к стимуляции роста микрообегов *in vitro* у препаратов была также выявлена в десятикратно увеличенной концентрации. Оценка росторегулирующей активности исследуемых веществ в концентрации 4 мг/л приведена в табл. 3. В концентрации 4 мг/л по влиянию на общее состояние мериклонов выделились препараты фуролан (4,1 балла, различие со стандартом существенно), I-1 (3,8 балла, различие со стандартным вариантом (3,5 балла) несущественно).

Среды с фуроланом и препаратом I-1 оказывают наибольший эффект удлинения: доля эксплантов, развивших стебель, соответственно 55,6 и 45 % (стандарт – 21 %, различие существенно). Максимальная доля эксплантов со здоровой зелёной окраской листьев образуется на среде с фуроланом (68 %, стандарт – 40 %, различие существенно). По каллусогенезу выделились препараты II-2 и Л-1: доля мериклонов, регенерировавших каллус у основания побегов, – 10 %, стандарт – 4,5 %.

В концентрации 4 мг/л препараты фуролан и I-1 оказывают эффективное мультиплицирующее воздействие на растения: коэффициент размножения 3,8 и 3,9 соответственно (в стандартном варианте: 3,3, различие

в обоих вариантах существенно, контрольный вариант из-за низкого коэффициента размножения в расчёт не брали). Корнеобразующего воздействия на мериклоны у изученных ростовых веществ в концентрации 4 мг/л также не выявлено.

Таблица 3 – Состояние эксплантов (подвой серии СК и ММ106) на средах с различными ростовыми (концентрация 4 мг/л) веществами после 3 пассажа

Ростовое вещество	Число листьев на одном экспланте	Коэффициент размножения	Общее состояние микрорастений по 5-балльной шкале	Число растений с интенсивной зелёной окраской листьев, %	Число растений со стеблем, %	Число растений с каллусом у основания микропобега более 4 мм, %	Число растений с корнями, %
Л-1	3,5	3,0	3,1	50	11,6	10,0	0
I-1	5,9	3,8	3,8	47	45,0	0	0
II-2	4,7	3,3	3,2	41	17,3	10,0	0
Фуrolан	6,3	3,9	4,1	68	55,6	4,3	0
6-БАП 1 мг/л + ИМК 0,1 мг/л + ГК 0,5 мг/л (st)	4,0	3,3	3,5	40	21,0	4,5	0
Без ростовых веществ (контроль)	3,0	1	3,0	37	20,0	4,2	0
НСР ₀₅	1,3	0,4	0,4	11	17	3,7	

Установлено, что наибольшее число листьев (6,3 шт.) образуется на среде с фуrolаном; растения, выращенные на средах с добавлением вещества I-1, регенерируют, в среднем, 5,9 листа на экспланте (стандарт – 4,0 листа, различие существенно в первом случае (см. табл. 3).

Таким образом, воздействие изученных препаратов на микропобеги в концентрации 4 мг/л также сходное с цитокининами (увеличение коэффициента размножения на 0,5-0,6 единиц), к тому же происходит улучшение общего состояния микропобегов: увеличивается число образовавшихся листьев на побег, больший процент эксплантов формирует здоровую зелёную окраску листьев и стеблей.

На рис. 2 приведены фотографии микропобегов подвоя СК 4 на средах с фуроланом и стандартной композицией ростовых веществ: БАП 1,0 мг/л, ГК 0,5 мг/л, ИМК 0,1 мг/л.



Рис. 2. Микрорастения подвоя СК 4: слева на среде с фуроланом 4 мг/л, справа – на среде с БАП и гиббереллиновой кислотой, ИМК (стандарт)

Целью следующей серии опытов было выявление оптимальной концентрации выделившегося ростового вещества фуролан. Испытаны 4 концентрации: 0,4 мг/л, 4 мг/л, 8 мг/л, 40 мг/л. Результаты исследования приведены в табл. 4. По всем показателям качества микропобегов выделились экспланты на среде с фуроланом в концентрации 4 мг/л (различие со стандартом по всем показателям существенно). При концентрации ростовых веществ 40 мг/л происходит угнетение микропобегов.

Важным фактором эффективности клонального микроразмножения является генотипическая реакция различных подвоев на компоненты питательных сред, в частности, регуляторы роста. В предыдущих наших исследованиях эффективным препаратом при клональном микроразмножении подвоев яблони серии СК и ММ 106 оказался сукцинат калия [4].

С целью изучения генотипической восприимчивости подвоев к выделившимся препаратам фуролан и сукцинат калия *in vitro* проведена регенерация эксплантов подвоев СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106 на среде МС с различными композициями ростовых веществ. В качестве стандартного

варианта использована композиция ростовых веществ 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ИМК и 0,5 мг/л ГК, в качестве контроля – среда без ростовых веществ. Оценивали выход стандартных микропобегов, способных к дальнейшему укоренению. В каждом варианте опыта высажено 100 эксплантов. Результаты исследований даны в табл. 5.

Таблица 4 – Состояние эксплантов (подвой серии СК и ММ106) на средах с препаратом фуrolан в различных концентрациях

Вариант	Число листьев на одном экспланте, шт.	Коэффициент размножения	Общее состояние микрорастений по 5-балльной шкале	Число растений с интенсивной зелёной окраской листьев, %	Число растений со стеблем, %	Число растений с каллусом у основания микропобега более 4 мм, %	Число растений с корнями, %
Фуrolан 0,4 мг/л	5,5	3,3	3,8	60,0	40,2	2,1	0
Фуrolан 4 мг/л	6,1	4,1	4,2	70,0	62,1	4,2	0
Фуrolан 8 мг/л	2,0	3,0	3,4	56,3	60,5	0	0
Фуrolан 40 мг/л	1,0	3,0	2,5	0	20,0	0	0
6-БАП 1 мг/л + ИМК 0,1 мг/л + ГК 0,5 мг/л (st)	3,9	3,2	3,4	41,0	23,0	4,4	0
Без ростовых веществ (контроль)	2,9	1	3,0	35,0	19,0	4,0	0
НСР ₀₅	1,9	0,5	0,6	14	19,3	2	

Таблица 5 – Уровень регенерации микропобегов (%) у эксплантов экспериментальных подвоев

Подвой / стимулятор роста	СК 2	СК 3	СК 4	СК 7	ММ 106	среднее
Сукцинат калия 4 мг/л	83,3	45,4	66,7	60,4	63,7	63,9
Фуrolан 4 мг/л	88,4	50,2	70,5	63,3	66,8	67,8
6-БАП 1 мг/л + ИМК 0,1 мг/л + ГК 0,5 мг/л (st)	69,7	42,5	62,1	55,3	56,6	57,2
МС без ростовых веществ (контроль)	59,5	35,4	54,6	47,5	49,4	49,0
среднее	75,2	43,4	63,5	56,6	59,1	НСР ₀₅ = 6,9

Применение на этапах введения в культуру *in vitro*, а также регенерации и мультипликации микропобегов новых в клональном микроразмножении стимуляторов роста, аналогичных по своему действию стандартной композиции 6-БАП, ГК, ИМК, но более экономичных, позволяет снизить себестоимость оригинального посадочного материала подвоев яблони, как конечного продукта технологии клонального микроразмножения. Кроме того, данные препараты, в частности фуrolан, при использовании его в среде МС в качестве стимулятора роста, повышает выход стандартных микропобегов, способных к дальнейшему укоренению на 10 % относительно стандарта (композиции 6-БАП, ГК, ИМК) и улучшает качество микропобегов (число листьев, интенсивность окраски и др.), что, в конечном счёте, повышает эффективность всей технологии.

Одновременно с изучением новых ростовых веществ в процессе совершенствования методики клонального микроразмножения подвоев яблони (СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106) изучено 7 вариантов питательных сред Мурасиге-Скуга с различным содержанием традиционных стимуляторов роста: 6-БАП, ИМК, α -НУК.

Задача – подбор наиболее эффективных композиций фитогормонов. Контроль - среда, приготовленная по В.А. Высоцкому и др. [8-11]. Культивировалось свыше сотни эксплантов. Произведено 4 пассажа. Пролиферация эксплантов началась на 2-м пассаже.

Максимальный коэффициент размножения микропобегов (4 ед.) получен на средах № 3, 4, 5. В контроле – 1,9 (табл. 6).

Лучшие показатели размножения микропобегов получены на средах с повышенным содержанием 6-БАП (варианты 3, 4, 5) и соотношением 6-БАП к ИМК, в котором содержание 6-БАП значительно превышает содержание ИМК (вариант 5). Полученные результаты в целом соответствуют современным представлениям о ростовой активности использованных препаратов [2, 5, 7-11].

Таблица 6 – Составы питательных сред и результат клонального микроразмножения подвоев яблони

№	Компоненты среды	St	1	2	3	4	5	6
1	Макросоли МС мг/л	50	50	50	50	50	50	50
2	Микросоли МС мг/л	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	Хелат железа мг/л	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
4	Мезоинозит мг/л	100	100	100	100	100	100	100
5	В ₁ мг/л	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
6	В ₆ мг/л	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
7	Рр мг/л	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
8	С мг/л	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
9	6-БАП мг/л	1,0	0,5	1,0	2,0	2,0	1,5	0,5
10	ИМК мг/л	0,2	0,1	0,0	0,2	0,0	0,05	0,1
11	а-НУК мг/л	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,05	0,1
12	Сахароза г/л	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
13	Агар-агар г/л	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Коэффициент размножения		1,4	2,1	3,1	4,5	4,7	4,6	2,9
НСР ₀₅		1,2						

Важным этапом технологии клонального микроразмножения является этап ризогенеза микропобегов. Нами была изучена способность к укоренению *in vitro* подвоев яблони при различных концентрациях индолил-масляной кислоты. Было изучено 4 концентрации ИМК: 1,0 мг/л (стандарт), 1,5 мг/л, 2,0 мг/л, 2,5 мг/л. В каждом варианте опыта 100 микропобегов. Среду готовили по прописи Мурасиге-Скуга. Оценивали процентную долю укоренившихся микропобегов. Результаты опыта приведены в табл. 7.

Таблица 7 – Доля укоренившихся микропобегов *in vitro* (%) подвоев яблони при различных концентрациях ИМК

Подвой / концентрация, мг/л	СК 2	СК 3	СК 7	ММ 106
1,0	60,0	58,0	64,0	69,0
1,5	64,0	61,0	68,0	78,0
2,0	68,0	65,0	75,0	90,0
2,5	50,0	48,0	52,0	54,0

Установлено, что максимально интенсивно экспланты образуют корни при концентрации ИМК в среде 2,0 мг/л. Степень укоренения при этом достигает 65-90 % в зависимости от подвоя. С помощью статистической обработки выявили, что для вариантов концентрации ИМК 1,0-2,0 мг/л ко-

эффициент корреляции по всем типам подвоев равен 1, что означает, что с повышением концентрации ИМК от 1,0 мг/л до 2,0 мг/л способность к укоренению микрорастений подвоев возрастает. Дальнейшее повышение концентрации до 2,5 мг/л ведёт к снижению способности к укоренению. Таким образом, оптимальной концентрацией ИМК в среде для укоренения подвоев СК 2, СК 3, СК 7, ММ 106 является 2,0 мг/л (табл. 7). На рисунке 3 даны фотографии укоренившихся микрорастений подвоя СК 2



Рис. 3. Укоренённые микрорастения подвоя СК 2

Структурообразующие компоненты и минеральный состав питательных сред для размножения и оздоровления подвоев яблони in vitro

В связи с тем, что традиционно используемый в технологии клонального микроразмножения агар-агар является дорогостоящим препаратом, как было указано во введении данной статьи, было проведено исследование по созданию питательных сред на основе альтернативных структурообразователей.

Одной из целей нашего исследования явилась замена в среде Мура-сиге-Скуга, агар-агара на картофельный крахмал.

В опыте 3 варианта:

– среда МС, в которой в качестве желирующего компонента использован агар-агар бактериологический 8 г/л среды;

– среда с минеральной основой по Мурасиге-Скугу, вместо агар-агара введён пищевой картофельный крахмал 40 г/л среды;

– среда с минеральной основой по Мурасиге-Скугу в качестве желирующих компонентов использованы одновременно агар-агар бактериологический 4 г/л среды и пищевой картофельный крахмал 20 г/л среды.

Состояние микропобегов оценивали по показателям количества здоровых развитых листьев на микрорастении и интенсивности окраски листьев и стеблей через 30-40 дней культивирования на испытуемых средах.

Таблица 8 – Результаты изучения картофельного крахмала как структурообразователя питательных сред

Изучаемые показатели	Пассажи	М-С + агар-агар (стандарт)			М-С + крахмал			М-С + агар + крахмал			HCP ₀₅
		СК 2	СК 3	СК 4	СК 2	СК 3	СК 4	СК 2	СК 3	СК 4	
Количество листьев, шт	1	5	4	5	8	9	11	9	4	6	
	2	9	7	6	7	5	12	5	7	5	
	3	6	10	6	4	10	7	6	8	4	
	в среднем	7	7	6	6	8	10	7	6	5	1,1
Интенсивность окраски, баллы	1	4	4	4	5	5	5	4	4	4	
	2	5	4	4	5	5	5	4	4	4	
	3	4	4	4	5	4	5	4	4	5	
	в среднем	4	4	4	5	5	5	4	4	4	0,4

Согласно результатам эксперимента (табл. 8), на питательных средах с крахмалом микрорастения семечковых культур развивают большее количество листьев (6-10 шт.) и более интенсивно накапливают хлорофилл (плотность зелёного цвета поверхности листа 5 баллов), чем в стандартном варианте на агаризованной питательной среде (6-7 шт. листьев и 4 балла плотность цвета, различие существенно). Однако, при застывании поверхность сред на основе крахмала неровная, бугристая, что делает такую среду нетехнологичной, соответственно, использование крахмала в качестве

желирующего компонента питательных сред в клональном микроразмножении подвоев яблони затруднено. Учитывая положительное влияние замены агар-агара на крахмал в питательной среде на рост и развитие микропобегов, данный вопрос требует дальнейшей проработки.

Известно, что при определённых характеристиках (содержание ионов Ca^{2+} , соответствующее 0,9-1,2 % для студней с пониженным содержанием сахара 45 %), пектин способен образовывать прочные студни, прочность которых свыше 93,31 кПа [12].

В связи с поиском заменителей агар-агара, был проведён опыт по созданию питательных сред на основе яблочно-цитрусового пектина WECJ-5 с прочностью геля $150 \pm 5^\circ \text{SAG}$, $\text{pH}=3 \pm 0,3$. Среды готовились по прописи Мурасиге-Скуга, автоклавирование проводилось при давлении 1 атм в течение 20 минут, за исключением варианта 3.

В опыте 4 варианта:

- 1 – 8 г пектина на 1 л среды,
- 2 – 8 г пектина+ 8 г агар-агара на 1 л среды,
- 3 – 8 г пектина+ 8 г агар-агара на 1 л среды без автоклавирования,
- 4 – 8 г агар-агара на 1 л среды (контроль).

Оценивали технологические качества среды и учитывали долю эксплантов, регенерировавших микропобеги к 1 пассажу (табл. 9).

Среды № 1 и 2 оказались жидкими, то есть нетехнологичными в работе с апикальными меристемами. Среда № 3 по консистенции соответствовала контролю, pH среды составил 4, то есть чрезвычайно кислый для большинства плодовых растений, в том числе клоновых подвоев яблони. Экспланты, культивируемые на этой среде, испытывали угнетение и погибали в течение 1-2 месяцев. Среда № 4 (контроль) была оптимальной по технологическим качествам (прочный студень) и благоприятной для развития микропобегов подвоев яблони (доля эксплантов, регенерировавших микропобеги, составила 60%, см. табл. 9).

Таблица 9 – Результаты изучения яблочно-цитрусового пектина как структурообразователя питательных сред

№	Вариант среды	Доля эксплантов, регенерировавших микропобеги, %
1	МС + 8 г пектина на 1 л среды	Нетехнологичная среда
2	МС + 8 г пектина+ 8 г агар-агара на 1 л среды	Нетехнологичная среда
3	МС + 8 г пектина+ 8 г агар-агара на 1 л среды без автоклавирования	0
4	МС + 8 г агар-агара на 1 л среды (контроль)	60

Ещё одним направлением оптимизации клонального микроразмножения является подбор наиболее эффективных составов макро- и микроэлементов. В нашем эксперименте на этапе мультипликации микропобегов подвоев яблони были испытаны часто применяемые среды Мурасиге-Скуга и Боксуса. В каждом варианте опыта учитывали по 100 микропобегов. Через 30 дней культивирования микропобегов на испытываемых средах, была проведена оценка их состояния по показателям: общее состояние растений (по 5-балльной шкале), количество листьев на микропобег. Сравнительные результаты показателей развития микропобегов на средах Боксуса и Мурасиге-Скуга даны в табл. 10.

Таблица 10 – Средние показатели развития микропобегов и количества листьев на них за один пассаж *in vitro*

Сорт	Общее состояние микропобегов, баллы (в среднем)		Среднее количество листьев через 30 дней культивации, шт.	
	Среда МС (стандарт)	Среда Боксуса	Среда МС (стандарт)	Среда Боксуса
СК 2	5	4	7	5
СК 3	4	3	4	2
СК 4	5	3	6	4
СК 7	4	3	5	3
ММ 106	5	3	5	3
среднее	4,6	3,2	5,4	3,4
НСР ₀₅	0,7		1,1	

Как видно из табл. 10, общее состояние микропобегов всех подвоев на среде МС существенно выше (4,6 балла), чем на среде Боксуса (3,2 балла). Среднее количество развитых листьев на микропобег также существенно выше на среде МС (5,4 шт.) по сравнению с микропобегами на среде Боксуса (3,4 шт.) у всех изучаемых подвоев. Таким образом, для клонального микроразмножения подвоев яблони серии СК и ММ 106 целесообразно применять среду Мурасиге-Скуга.

Анализ полученных данных позволил сделать вывод о том, что оптимальной средой для культивирования подвоев яблони серии СК является среда с минеральным составом по прописи Мурасиге-Скуга с заменой агар-агара на картофельный крахмал.

Адаптация микрорастений к нестерильным условиям среды. С целью уменьшения доли погибших оздоровленных растений на этапе адаптации к нестерильным условиям среды нами были заложены три серии опытов по улучшению условий адаптации. Задачей первой серии опытов являлась оценка эффективности различных почвенных субстратов для приживаемости микрорастений подвоев СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106.

В 1-ом варианте растения высажены в торфяные контейнеры, заполненные торфяной смесью. Во 2-ом варианте использовался модифицированный чернозем - стабилизированный в течение суток при температуре 100°C выщелоченный чернозём с добавлением половинного раствора солей по прописи Мурасиге-Скуга. В контрольном варианте использовался субстрат, приготовленный из 1/3 песка; 1/3 чернозёма; 1/3 торфа. Во всех вариантах высажено по 200 растений (табл. 11).

В результате опыта установили, что лучше всего развились и хорошо прижились растения, высаженные на модифицированном черноземе: 180 шт. адаптированных из 200 высаженных (90%). В 1-ом варианте прижилось 51 шт. адаптантов из 200 шт. высаженных (25,5%), в контроле 96 шт. (48%) за тот же период времени.

Таблица 11 – Приживаемость адаптантов на различных субстратах

Вариант	Высажено растений		Адаптировано растений	
	шт.	%	шт.	%
1. Торфяная смесь	200	100	51	25,5
2. Модифицированный чернозём	200	100	180	90
3. Песок: чернозём: торф = 1:1:1 (контроль)	200	100	96	48

На основе проделанной работы можно заключить, что для адаптации мериклонов вегетативно-размножаемых подвоев яблони лучше применять в качестве субстрата модифицированный чернозём. Его высокие адаптивные качества можно объяснить как внешней обработкой: добавлением комплекса макро- и микроэлементов, повышающих питательные свойства субстрата, и длительной тепловой обработкой, saniрующей субстрат от болезнетворных микроорганизмов, так и собственными выдающимися физико-химическими свойствами чернозёма выщелоченного.

Задачей второй серии опытов был подбор оптимального объёма контейнеров для пересадочной культуры мериклонов. Объекты исследований – микрорастения подвоев СК 2, СК 3, СК 4, СК 7, ММ 106. Адаптанты были высажены в сосуды разного объёма (1 вариант – 1500 л, 2 вариант 800 мл, 3 вариант - 400 мл, 4 вариант - 200 мл), заполненные модифицированным чернозёмом. На каждый вариант высаживалось по 50 мериклонов (табл. 12).

Таблица 12 – Приживаемость адаптантов в контейнерах различного объёма

Вариант	Размер культивационного сосуда, мл	Прижилось адаптантов	
		шт.	%
1	1500	39	78
2	800	40	80
3	400	33	66
4	200	0	

Процентная приживаемость по вариантам в данном опыте составила: 1 вариант – 78 %, 2 вариант – 80 %, 3 вариант – 66 %, 4 вариант – 0 % (полная гибель). По данным опыта видно, что максимальная приживаемость микрорастений (80 %) на этапе адаптации отмечена в сосудах 800 мл. При уменьшении объёма сосуда, снижается приживаемость адаптантов (при объёме 400 мл – приживаемость 65 %), а сосуды объемом 200 мл показали отрицательный результат с полной гибелью микрорастений (табл. 12, рис. 4). Это связано с быстрым иссушением субстрата в контейнерах малого объёма.

В сосудах объёмом 1500 мл приживаемость микрорастений на том же уровне, что и при объёме 800 мл, однако развитие адаптантов происходит медленно. Это, предположительно, связано с тем, что корневая система медленно нарастает, и пока не заполнит весь объём, не происходит развития надземной части растений.

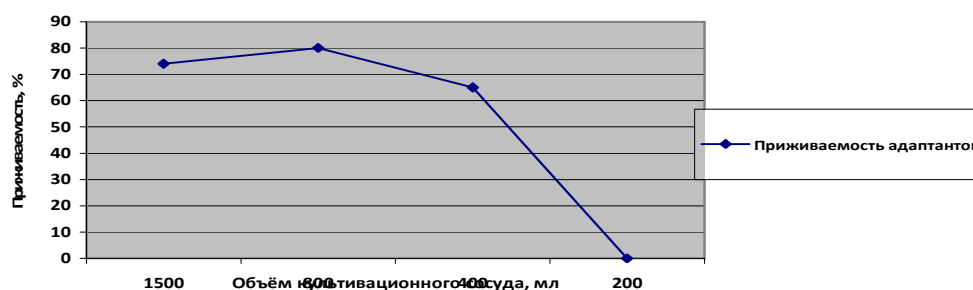


Рис. 4. Приживаемость адаптантов в контейнерах различного объёма

Таким образом, оптимальным объёмом культивационного сосуда для адаптации подвоев яблони к нестерильным условиям является сосуд 800 мл, можно также использовать сосуды 400 мл, не следует проводить адаптацию растений в сосудах 200 мл, так при этом происходит быстрое иссушение субстрата и все адаптанты гибнут.

Задачей третьей серии опытов по адаптации явилось определение оптимальной степени развития микрорастений вегетативно-размножаемых

подвоев яблони для пересадки их в почвенный субстрат в нестерильные условия (начало адаптации). Опыт призван обеспечить высокий выход адаптируемых растений.

В схеме опыта два варианта.

Первый вариант составили растения, достигшие размера 5-10 см, с хорошо развитой корневой системой (4-5 корешка длиной 2-5 см.).

Второй вариант – это растения средней и небольшой величины (3-4 см), со слабо развитой корневой системой. В каждом варианте растения были высажены в количестве 80 шт. В качестве посадочной тары применялись пластиковые контейнеры, в качестве субстрата использовался модифицированный чернозём.

Растения содержались при комнатной температуре в течение 2-х недель с момента высадки в субстрат, накрытые пленкой для поддержания оптимальной влажности. Затем микрорастения были перенесены в фитотрон, с температурой воздуха 24-28°C и искусственным досвечиванием. К этому времени растения были полностью переведены в режим с открытым доступом воздуха. До этого проводилось проветривание, начиная с 15 минут и до 3-4 часов в сутки.

Результаты опыта приведены в табл. 13.

Таблица 13 – Приживаемость адаптантов с различной степенью развития стебля и корневой системы

№ п\п	Вариант	Прижилось адаптантов, шт./%
1	Растения, достигшие размера 5-10 см, с хорошо развитой корневой системой (4-5 корешка длиной 2-5 см.)	72 / 90
2	Растения средней и небольшой величины (3-4 см), со слабо развитой корневой системой	44 / 55

В результате наблюдения за состоянием объектов установили, что лучше всего развились и хорошо прижились растения первого варианта (размер 5-10 см, 4-5 корешка длиной 2-5 см). Растения второго варианта, размером 3-4 см, подверглись большому подвяданию, тургор некоторых листьев не восстановился. В период адаптации в первом варианте погибло 8 растений из 80, а во втором - 36 растений из 80 шт. (табл. 13). При этом необходимо отметить, что растения первого варианта имели хороший внешний вид, значительно опережали в росте и развитии второй вариант.

На рис. 5 представлены адаптированные растения подвоя СК 2.



Рис. 5. Адаптированные растения СК 2:

слева – 1 вариант – для начала адаптации выбраны растения, достигшие размера 5-10 см, с хорошо развитой корневой системой (4-5 корешка длиной 2-5 см),

справа – 2 вариант – для начала адаптации выбраны растения средней и небольшой величины (3-4 см), со слабо развитой корневой системой.

Выводы. Можно заключить, что при испытании ранее не применявшихся в клональном микроразмножении малотоксичных, экологически чистых, экономичных стимуляторов роста (производные и композиции органических кислот и препараты, синтезированные на основе фурфурола)

по основным показателям качества эксплантов выделились препарат фурулан. Оптимальной концентрацией для него оказалась 4 мг/л.

Максимальной регенерационной способностью на средах с препаратами фурулан и сукцинат калия обладают экспланты подвоя СК 2, далее по регенерационной способности в порядке убывания следуют СК 4, ММ 106, СК 7, СК 3. В связи с этим возможно использование препарата фурулан как менее опасного, более экономичного аналогов традиционно используемым ростовым веществам (комплекс 6-БАП, ИМК, ГК) с эффективностью на том же уровне и выше, что значительно снизит себестоимость оздоровленного посадочного материала и повысит безопасность технологии клонального микроразмножения подвоев яблони.

При испытании питательных сред Мурасиге-Скуга с различным содержанием традиционных стимуляторов роста лучшие показатели коэффициента размножения микропобегов получены на средах с повышенным содержанием 6-БАП и соотношением 6-БАП и ИМК, в котором содержание 6-БАП значительно превышает содержание ИМК.

Оптимальной средой для культивирования подвоев яблони серии СК является среда с минеральным составом по прописи Мурасиге-Скуга с заменой агар-агара на картофельный крахмал.

Адаптацию микрорастений подвоев яблони следует начинать с момента, когда растения достигнут размера 5-10 см, а их корневая система будет состоять из нескольких хорошо развитых корешков, длиной 2-5 см в 800 мл сосудах на субстрате стабилизированный в течение суток при температуре 100 °С выщелоченный чернозём с добавлением половинного раствора солей по прописи Мурасиге-Скуга.

Литература

1. 6-Benzylaminopurine / Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b3408?lang=en®ion=RU>

2. Gibberellic acid / Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g7645?lang=en®ion=RU> 210.
3. Агар бактериологический / Catrosa [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.catrosa.ru/catalog/mikrobiologiya/210/>
4. Высоцкий, В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07 / Высоцкий Валерий Александрович. – М., 1998. – 44 с.
5. Высоцкий, В.А. Использование методов культуры изолированных тканей и органов для оздоровления и ускоренного размножения плодовых и ягодных растений / В.А. Высоцкий // Селекция плодовых и ягодных культур: сб. науч. тр. ВАСХНИЛ Сиб. отд-ние НИИСС. – Новосибирск, 1989. – С. 132-138.
6. Высоцкий, В.А. Микрклональное размножение яблони / В.А. Высоцкий, О.А. Леонтьев-Орлов // Садоводство. – 1983. – № 7. – С. 20-21.
7. Джигадо, Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / под ред. Е.Н. Джигадо. – Орёл: ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 50 с.
8. Абраменко, Н.М. Укоренение в нестерильных условиях побегов плодовых, размноженных *in vitro* / Н.М. Абраменко, Р.В. Стаканова, А.М. Чернец // Культура клеток растений и биотехнология: Тез. докл. науч. конф. - Кишинев: Штица, 1983. – С. 112.
9. Бунцевич, Л.Л. Влияние удобрений нового поколения на адаптацию оздоровленных мериклонов земляники *ex vitro* / Л.Л. Бунцевич, Е.Н. Палецкая // Материалы IV Всероссийской науч.-практ. конф. молод. учёных «Научное обеспечение агропромышленного комплекса». – Краснодар: КубГАУ, 2010. С. 215-217.
10. Патент 2076866 Российская Федерация МПК C07D407/04, C07D407/04, C07D307:34, C07D317:08. Способ получения 2-(фурил-2) -1,3-диоксала (фуrolана) / Косулина Т.П., Кульневич В.Г., Смоляков В.П., Ненько Н.И.; заявитель и патентообладатель Кубанский государственный технологический университет. – № 94024313/04; заявл. 29.06.1994, опубл. 10.04.1997. – 3 с.
11. Бунцевич, Л.Л. Оптимизация питательных сред при клональном микроразмножении подвоев яблони серии СК / Л.Л. Бунцевич, А.Т. Киян, Е.Н. Беседина, М.А. Костюк // Плодоводство и ягодоводство России. - 2013. - XXXVII том. - С.46-51.
12. Агафонов, Н.В. Применение регуляторов роста для укоренения, размножения и повышения продуктивности плодовых и ягодных культур / Н.В. Агафонов, З.Н. Алинтаев, К.В. Дмитриева, Л.А. Рабей, В.А. Высоцкий, Ф.Я. Поликарпова, Е.М. Устименко-Бакумовская, А.А. Борисова // Применение регуляторов роста растений в с.-х. производстве: сб. науч. трудов ЦИНАО. - М., 1985. – С. 83-94.
13. Бутенко, Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
14. Вердеревская, Т.Д. Получение и ускоренное размножение безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур / / Т.Д. Вердеревская, Н.М. Абраменко // Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии. –1984. – № 6. – С. 26-28.
15. Ильина, И.А. Теоретическое и экспериментальное обоснование технологии модифицированных пектинов: дис. ... д-ра техн. наук: 05.18.01/ Ильина Ирина Анатольевна. – Краснодар, 2001. – 287 с.

References

1. 6-Benzylaminopurine / Sigma-Aldrich [Elektronnyj resurs]. – 2015. – Rezhim dostupa: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b3408?lang=en®ion=RU> 209
2. Gibberellic acid / Sigma-Aldrich [Elektronnyj resurs]. – 2015. – Rezhim dostupa: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g7645?lang=en®ion=RU> 210
3. Agar bakteriologicheskij / Catrosa [Elektronnyj resurs]. – 2015. – Rezhim dostupa: <http://www.catrosa.ru/catalog/mikrobiologiya/210/>
4. Vysockij, V.A. Biotehnologicheskie metody v sisteme proizvodstva ozdorovlennogo posadochnogo materiala i selekcii plodovyh i jagodnyh rastenij: avtoref. dis. ... d-ra s.-h. nauk: 06.01.07 / Vysockij Valerij Aleksandrovich. – M., 1998. – 44 s.
5. Vysockij, V.A. Ispol'zovanie metodov kul'tury izolirovannyh tkanej i organov dlja ozdorovlenija i uskorennoho razmnozhenija plodovyh i jagodnyh rastenij / V.A. Vysockij // Selekcija plodovyh i jagodnyh kul'tur: sb. nauch. tr. VASHNIL Sib. otd-nie NIIS. – Novosibirsk, 1989. – S. 132-138
6. Vysockij, V.A. Mikroklonal'noe razmnozhenie jabloni / V.A. Vysockij, O.A. Leont'ev-Orlov // Sadovodstvo. – 1983. – № 7. – S. 20-21.
7. Dzhigadlo, E.N. Metodicheskie rekomendacii po ispol'zovaniju biotehnologicheskikh metodov v rabote s plodovymi, jagodnymi i dekorativnymi kul'turami / pod red. E.N. Dzhigadlo. – Orjol: GNU VNIISPK, 2005. – 50 s.
8. Abramenko, N.M. Ukorenenie v nesteril'nyh uslovijah pobegov plodovyh, razmnozhennyh in vitro / N.M. Abramenko, R.V. Stakanova, A.M. Chernec // Kul'tura kletok rastenij i biotehnologija: Tez. dokl. nauch. konf. - Kishinev: Shtiica, 1983. – S. 112.
9. Buncevic, L.L. Vlijanie udobrenij novogo pokolenija na adaptaciju ozdorovlennyh meriklonov zemljaniki ex vitro / L.L. Buncevic, E.N. Paleckaja // Materialy IV Vserossijskoj nauch.-prakt. konf. molod. uchjonyh «Nauchnoe obespechenie agropromyshlennogo kompleksa». - Krasnodar: KubGAU, 2010. S. 215-217.
10. Patent 2076866 Rossijskaja Federacija MPK C07D407/04, C07D407/04, C07D307:34, C07D317:08. Sposob poluchenija 2-(furyl-2) -1,3-dioksalana (furofurala) / Kosulina T.P., Kul'nevich V.G., Smoljakov V.P., Nen'ko N.I.; zayavitel' i patentoobladatel' Kubanskij gosudarstvennyj tehnologicheskij universitet. – № 94024313/04; zayavl. 29.06.1994, opubl. 10.04.1997. – 3 s.
11. Buncevic, L.L. Optimizacija pitatel'nyh sred pri klonal'nom mikrorazmnozhenii podvoev jabloni serii SK / L.L. Buncevic, A.T.Kijan, E.N. Besedina, M.A. Kostjuk // Plodovodstvo i jagodovodstvo Rossii. - 2013. - XXXVII tom. - S.46-51.
12. Agafonov, N.V. Primenenie reguljatorov rosta dlja ukorenenija, razmnozhenija i povyshenija produktivnosti plodovyh i jagodnyh kul'tur / N.V. Agafonov, Z.N. Alintaev, K.V. Dmitrieva, L.A. Rabej, V.A. Vysockij, F.Ja. Polikarpova, E.M. Ustimenko-Bakumovskaja, A.A. Borisova // Primenenie reguljatorov rosta rastenij v s.-h. proizvodstve: sb. nauch. trudov CINAO. - M., 1985. – S. 83-94.
13. Butenko R.G. Kul'tura izolirovannyh tkanej i fiziologija morfogeneza rastenij. M.: Nauka, 1964. 272 s.
14. Verderevskaja, T.D. Poluchenie i uskorennoe razmnozhenie bezvirusnogo posadochnogo materiala plodovyh i jagodnyh kul'tur / / T.D. Verderevskaja, N.M. Abramenko // Sadovodstvo, vinogradarstvo i vinodelie Moldavii. –1984. – № 6. – S. 26-28.
15. Il'ina, I.A. Teoreticheskoe i jeksperimental'noe obosnovanie tehnologii modifizirovannyh pektinov: dis. ... d-ra tehn. nauk: 05.18.01/ Il'ina Irina Anatol'evna. – Krasnodar, 2001. – 287 s.