

УДК 631.535.5

ПРОБЛЕМЫ И ВОЗМОЖНОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ САДОВЫХ РАСТЕНИЙ. ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ

В. И. ДЕМЕНКО

(Кафедра плодоводства)

В статье приводятся данные многолетних опытов по введению в культуру большого числа видов растений. Показана важность воздействия на экспланты температуры, электростатического поля, дефолиации, этиоляции. Представлена методика подбора солевого состава среды, а также показана необходимость использования в качестве регуляторов роста гиббереллина совместно с ССС, культуры, пике, кремнийорганических соединений, гумата натрия.

Прошло 30 лет после публикации Боксюса [4], которая положила начало промышленному размножению садовых растений *in vitro*. Его заслуга заключается в том, что он сумел оценить морфогенетическую реакцию эксплантов на применение ББАП в технологии размножения растений. Методы микроклонального размножения, несомненно, имеют достаточно преимуществ. Однако у них есть и недостатки. Они требуют больших затрат ручного труда, при этом более 50% времени тратится на работы, не связанные с растительным материалом. Для того чтобы свести к минимуму потери регенерантов на основных этапах размножения, требуется дорогое оборудование. Кроме технических микроклональное размножение имеет много и чисто биологических проблем. 30-летний опыт промышленного использования, а также данное исследование позволяют несколько по-иному оценить его значимость. В современных публикациях уже не встретишь высказывания о том, что коэффициент размножения может достигать $1:10^6$ — он теоретичес-

ки возможен, но не целесообразен по ряду причин.

Перед современными исследованиями в области микроклонального размножения стоят две основные проблемы. С одной стороны, это достижение экономически целесообразного коэффициента размножения, с другой — сведение к минимуму возможных отклонений от сорта. Они зависят от сорта и его возраста, склонности к образованию каллуса, типа экспланта, продолжительности культивирования, состава питательной среды, условий выращивания.

Процесс микроклонального размножения состоит из ряда последовательных этапов, каждый из которых имеет свою значимость и создает определенные проблемы. Первым этапом является отбор эксплантов и введение их в культуру. Он наиболее затратный. Производительность мала, а потери могут быть большими. Лаборатории, планирующие производить несколько миллионов растений в год, должны начинать такое производство с не менее 2000 сте-

рильных эксплантов. Однако задача первого этапа получить не только стерильные, но и способные к дальнейшему росту экспланты.

Культура изолированных органов и тканей растений в начале использовалась как метод исследований в физиологии растений. Большинство авторов ставили задачи длительного роста эксплантов. Поэтому среды, перенесенные с физиологических исследований, стимулируют развитие каллуса. Водный потенциал питательных сред примерно в 10 раз ниже, чем водный потенциал почвенного раствора при нормальной увлажненности почвы. Такая концентрация питательной среды необходима для выращивания растений *in vitro*, но может быть причиной возникновения стекловидности.

Для успешного размножения растений *in vitro* следует детализировать состав питательных сред с учетом многих факторов, влияющих на рост и развитие эксплантов. Это необходимо, так как среды, отработанные для одних условий, в полной мере не могут соответствовать для других. Условия выращивания могут влиять на метаболизм синтезируемых веществ и компонентов, добавляемых в среду.

Вопрос о составе макро- и микроэлементов в питательных средах, пожалуй, является наименее изученным разделом микрклонального размножения, несмотря на огромное количество публикаций. Большинство работ выполнены на основе минерального состава питательных сред Мурасига и Скуга, Уайта, Хеллера, Нича, раствора Кнопш. Выбор состава питательной среды усложняется тем, что получению целостного растения предшествуют несколько этапов размножения, при этом поведение экспланта может варьировать в зависимости от физиологического,

онтогенетического статуса растения. Для каждого сорта оптимальная среда должна подбираться индивидуально [6]. Большинство процессов роста и развития у целых растений и их отдельных органов могут нормально осуществляться лишь при участии физиологически активных веществ.

Одним из основных аргументов возможного интенсивного размножения растений *in vitro* является утверждение, что физиологические процессы у эксплантов проходят при строго контролируемых оптимальных условиях. Действительно, мы можем задать необходимые параметры температуры, света, влажности, состава питательной среды. Однако следует отметить, что экспланты, отделенные от маточного растения и подвергнутые стерилизации, находятся в стрессовом состоянии, а изменения в процессе выращивания газового состава внутри сосуда и состава питательной среды усиливают его. Если все это накладывается на неоптимальный состав среды, условия выращивания, то в процессе размножения возникают анатомо-физиологические расстройства, которые могут значительно снизить эффективность микрклонального размножения.

Наибольший ущерб наносят стекловидность, некроз верхушек, отсутствие кутикулярного слоя, нефункциональные устьица и неработающая корневая система. У одних растений признаки стекловидности (заполнение межклеточного пространства жидкостью) появляются уже на первых этапах размножения, у других стекловидность — явление редкое. Побег с признаками стекловидности при размножении *in vitro* производят себе подобных. Они редко укореняются, а полученные растения могут жить

только *in vitro*. Но даже, если степень проявления стекловидности незначительна, то перенести такие растения в нестерильные условия очень проблематично. Стекловидность связана с нарушением водного потенциала клеток экспланта, что, в свою очередь, объясняется нарушением процесса транспирации *in vitro*. Воздействие на стекловидные растения темнотой, АБК, антитранспирантами, манитолом, высокими концентрациями CO_2 , т. е. факторами, которые закрывают устьица у нормальных растений были безуспешными.

Так как перемещение макро-, микроэлементов происходит по кислоте и зависит от интенсивности транспирации, то экспланты *in vitro* часто испытывают недостаток в элементах питания, в частности Са, что является одной из причин некроза верхушек побегов *in vitro* [3].

Все аномальные явления, наблюдаемые у растений *in vitro*, связаны с изменениями в содержании и активности эндогенных гормонов. Ненормальная структура листьев и побегов может быть следствием и результатом потери полярности перемещения ауксина, что, в свою очередь, обусловлено интенсивным синтезом этилена. Получается замкнутый круг. Размножение растений *in vitro* невозможно без введения в питательную среду цитокининов и ауксинов, но эти регуляторы роста стимулируют синтез этилена, который вызывает развитие аномальных процессов. Таким образом, оптимальное соотношение экзогенных регуляторов роста в питательной среде очень важно для промышленного применения микрклонального размножения. Промышленное его использование возможно только при условии успешного переноса растений из *in vitro* в нестерильные условия.

Вследствие перечисленных выше физиологических расстройств, растения в нестерильных условиях испытывают водный стресс, что задерживает их рост или вызывает гибель [5]. К водному стрессу добавляется неспособность пробирочных растений к фотоавтотрофии [8]. Еще один фактор, создающий проблемы при пересадке растений в нестерильные условия — недостаточно функциональная корневая система. Корни растений, полученные *in vitro*, имеют особое анатомическое строение, их сосуды часто не связаны с сосудами побега, у них отсутствуют корневые волоски [7]. Поэтому у растений, которые перемещают в другие условия, либо должны адаптироваться старые их части, либо вырасти достаточно быстро новые. Желательно, чтобы эти два процесса происходили одновременно.

Адаптация пробирочных растений зависит от вида растений, времени пересадки. Те виды растений, которые быстро растут в нестерильных условиях, адаптируются без тщательного контроля за влажностью воздуха. Большинство видов растений, особенно древесные, необходимо начинать готовить к новым условиям еще *in vitro*. Для этого предлагают открывать сосуды на несколько дней; уменьшать влажность воздуха в сосуде, нанося на поверхность среды ланолиновую пасту; создавать температурный градиент внутри сосуда; наносить на листья антитранспиранты. Однако все эти воздействия часто не обеспечивают высокий процент приживаемости растений в нестерильных условиях. Несмотря на достаточную изученность многих физиологических процессов, до и после переноса, ответственных за приживаемость, мы не имеем простого технологического решения. Одни ре-

комендации сложны в исполнении, другие требуют сложного технического решения.

В связи с вышеизложенным все проведенные исследования были направлены на решения проблем, возникающих при микроклональном размножении с целью разработать технически не сложную технологию.

Условия и методы исследований

Работа выполнялась с 1976 г. по 2004 г. в НИЗИСНП и МСХА. В качестве объектов исследования были использованы различные жизненные формы растений (деревья, кустарники, лианы, травы). Экспланты растений были представлены меристоматическими верхушками, растущих побегов и боковых почек. На первом этапе использовали среду Мурасига и Скуга (М.С), содержащую 0,5 мг/л 6БАП и 0,5-0,01 мг/л ИМК. В процессе исследований изучали влияние температуры, этиоляции, дефолиации, электростатического поля на рост и развитие эксплантов плодовых и ягодных культур. Для устранения отрицательного влияния, выделяемых эксплантами фенолов испытывали витамин Е и различные способы посадки эксплантов. Стерилизацию эксплантов проводили сулемой, азотнокислым серебром и сернокислой медью. С целью определения оптимального состава — макро-, микроэлементы, хлористый кальций, хелат железа, питательных сред Мурасига и Скуга, Кноппа испытывали (1, 1/2, 1/3) при всех возможных комбинациях (81 вариант). Экспланты выращивались при 16-часовом дне, 23—25°C, освещенность 3000-3500 люкс.

Результаты исследований

Традиционно технология микроклонального размножения делится на 4 этапа. Однако данные, полу-

ченные в процессе наших исследований, предполагают их увеличение. Необходимо узаконить такие понятия, как выбор маточного растения, тип экспланта, физиологический и онтогенетический статус растения, предварительное воздействие на растение и эксплант.

Все этапы микроклонального размножения сопровождаются травмированием тканей, что приводит к образованию некротической прослойки. Неповрежденные клетки интенсивно делятся, вызывая образование каллуса. Поэтому уже на этапе введение в культуру необходимо создать условия для превалирования роста растяжением над ростом делением.

Количество эксплантов, пригодных для дальнейшего размножения, зависело от вида растений, сорта и состава питательной среды, способов предварительного воздействия на растение и эксплант (табл. 1).

Регенерационная способность эксплантов в наших опытах не зависела от жизненной формы маточного растения и не коррелировала со способностью испытанных видов к вегетативному размножению традиционными способами.

Реакция видов на общепринятую методику размножения *in vitro* позволяет их разделить на несколько групп.

Экспланты черешни, миндаля, грецкого ореха, лещины, лимонника, можжевельника погибали уже к концу первого пассажа без признаков увеличения его длины. Причины гибели эксплантов других культур (яблоня, ива козья, ирга канадская) были связаны с интенсивным выделением фенолов, с развитием каллуса и стекловидности (черешня, тополь серебристый, крыжовник). Очень долго оставались живы верхушки кедра, у которых преобла-

Таблица 1

Реакция эксплантов различных видов растений на введение в культуру
(среда М.С.; БАП 0,5 мг/л; ИМК 0,5-0,01 мг/л)

Вид	Жизненная форма	Способность к микрклональному размножению			
		% живых эксплантов после		% эксплантов	
		1-го пасса- жа	2-го пассажа	стекло- видных	с каллу- сом
Дерево	Яблоня	0-67	30	—	—
	Груша	60	40	10	—
	Черешня	33	0	100	90
	Вишня	80	56	—	—
	Вишня разноцвет.	70	19	11	10
	Магнолия кобус	27	9	20	50
	Тюльпанное дер.	63	50	0	0
	Робиния	100	100	0	0
	Грецкий орех	0	0	100	
	Лещина	75	0	100	
	Тополь сереб.	100	0	100	
	Кедр	90	0	—	—
	Клен Фламинго	75	60	50	—
	Клен японский	60	0		
	Миндаль махров.	90	0		
Ива козья	0	0			
Кустарник	Крыжовник	0-45	0	55	
	Камелия	0			
	Жимолость	90	0		
	Облепиха	0		100	
	Ирга канад.	0			
	Лох серебрист.	0			
	Шиповник	70	0		
	Рододендрон	60	30		
	Можжевельник каз.	70	2		
	Вейгела	100	100		
	Форзиция	60	100		
Пион древовид.	40	10			
Лианы	Бугенвилла	30	0		
	Лимонник	0			
	Киви	98	75		
Травы	Земляника	40-50	95	5	25
	Флокс	90	60	100	

дал интенсивным радикальный рост. Из всех видов только вейгелла, робиния, форзиция легко вводились в культуру, обеспечивая хорошее развитие материала для дальнейшего размножения *in vitro*.

Для получения желаемого роста на этапе введения в культуру, т. е. удлинения экспланта, необходимо стимулировать к росту растяжением субапикальную меристему. В субапикальной меристеме вторичная

меристема представлена прокамбием, его превращение в камбий контролируется гормонами. Только после этого в растущем экспланте создается функциональная сосудисто-проводящая система, обеспечивающая его рост в длину.

Характер развития эксплантов на питательной среде зависел от местоположения его на маточном растении (табл. 2), времени введения в культуру, состава питательной среды и возраста маточного растения.

Т а б л и ц а 2

Влияние положения почки на побеге крыжовника на ее регенерационную способность (сорт Русский, среда Фоссарда 6БАП 0,5 мг/л; НУК 0,1 мг)

№ почки от вершины побега	% регенерации	Кол-во листьев, шт.	Длина, мм
Верхушечная	45a	2,8	6,8
Вторая	65b	3,9	7Д
Третья	47a	3,3	6,4
Четвертая	30a	6,3	6,6
Пятая	20в	3,0	6,5
НСР ₀₅		2,4	1,8

Регенерационная способность эксплантов крыжовника уменьшалась по мере удаления от верхушки побега. Результаты опытов с земляничкой подтвердили пригодность меристематических верхушек рожков, усоплетей на этапе введения в культуру. Однако только пазушные меристемы усоплетей обеспечивали

100%-ю регенерацию, и культуры с большой степенью пролиферации. Нецелесообразным оказалось введение в культуру боковых почек взрослых растений яблони типа спур зимой и в фазу активного роста. Первые очень долго оставались в состоянии покоя, вторые выделяли в среду много фенолов. Наиболее высокой регенерационной способностью и быстрым началом активной пролиферации обладали экспланты, взятые с растений, выращиваемых в теплице в фазу активного роста.

Существенное влияние на реализацию морфогенетического потенциала оказывает возраст маточного растения (табл. 3).

Экспланты с молодых растений груши обладали более высоким морфогенетическим потенциалом, способны образовывать и развивать в большем количестве листьев, что в дальнейшем сказывается на коэффициенте размножения. Удаляя эксплант с маточного растения, мы фиксируем его физиологическое и анатомическое состояние, нарушая корреляционные связи с органами маточного растения. Поэтому успешное начало микроклонального размножения во многом зависит от того, на сколько условия *in vitro* приближены к состоянию целостного растения. Огромная роль в данном процессе отводится составу питательной среды. Однако, исследуя реакцию большого числа видов на этапе вве-

Т а б л и ц а 3

Влияние возраста маточного растения на регенерационную способность меристематических верхушек груши (сорт Лада, среда Кноппа 6БАП 0,5 мг/л, ИМК 0,1 мг/л)

Место взятия эксплантов	Кол-во листьев, шт.		Длина, мм		% приживаемости
	24-й день	35-й день	24-й день	35-й день	35-й день
Маточное растение (15 лет)	6	6,2	21,7	22,8	96
Окулянты	8	11,8	19,6	20,1	92
НСР ₁₅	1,4	1,9			

дения в культуру, можно сделать вывод, что для культур с плохой регенерационной способностью необходимы другие факторы воздействия на эксплант до и после его введения в культуру

В своих опытах мы исследовали влияние температуры, этиоляции, дефолиации, электростатического поля и др. Факторы, которые изучали в данном опыте (табл. 4), очевидно, создают стрессорные реакции, способствующие повышению регенерационной способности верхушек, что, очевидно, связано с увеличением содержания ИУК, а также с активацией системы антиоксидантной защиты [1]. Повышение содержания ИУК и активация антиоксидантной защиты являются определяющим на этапе введения в культуру. Практически 100%-я регенерация была отмечена в опыте с меристематическими верхушками крыжовника, подвергнутыми термотерапии (+38°C).

В процессе микроклонального размножения уже на этапе введе-

ния эксплантов в культуру могут возникнуть предпосылки для отклонения от сорта. Как правило, избежать их возможно, если уже в начале культивирования удастся получить единственный побег на средах, содержащих небольшие концентрации регуляторов роста, либо без них. Однако это трудно осуществить для ряда культур. В связи с этим изучали возможность выращивания верхушек в условиях электростатического поля. На разные виды растений его воздействие было неоднозначным (табл. 5).

Электростатическое поле стимулировало рост эксплантов в длину и увеличивало количество листьев. Максимальное увеличение отмечено для крыжовника (78%) и груши (46%). В данном опыте использовали меристематические верхушки боковых почек, которые в условиях *in vitro* долго не развиваются. С целью определения механизма действия электростатического поля на меристематические верхушки изучали совместное его

Т а б л и ц а 4

Влияние абиотических факторов на рост и развитие меристематических верхушек груши (сорт Лада, среда М.С.; БАП 1 мг/л; ИМК 0,5 мг/л)

Абиотические факторы	Приживаемость, %	Количество листьев, шт.	Длина, мм
Контроль	60а	3,2а	14,2а
Хранение при температуре 0~2°C	78б	4,7б	16а
Верхушки с дефолированных побегов	67а	9,6в	18,4б

Т а б л и ц а 5

Влияние электростатического поля на регенерацию меристематических верхушек различных растений (среда М.С.; БАП 0,2 мг/л; ИМК 0,05 мг/л)

Культура	Кол-во живых меристем, %		В т.ч. тронувшихся в рост меристем, %	
	контроль	электростат, поле	контроль	электростат, поле
Подвой 62-396	95	100	25	30
Крыжовник	0	58	0	90
Груша	90	100	60	90
Смородина крас.	45	55	55	70
Облепиха	61	83	0	0
Черешня	86	100	86	100

действие с регуляторами роста, для чего в питательную среду вводили култар, обладающий сильным антигиббереллиновым свойством. В качестве эксплантов использовали меристематические верхушки малого размера земляники и груши (табл. 6).

В контроле экспланты земляники отличались слабым ростом, больше половины погибли к концу первого пассажа. Култар существенно ингибировал рост верхушек в длину, но верхушки оставались жизнеспособными на протяжении наблюдений.

Электростатическое поле существенно увеличило рост верхушек земляники и груши и устранило ингибирующее действие култара. Электростатическое поле «защищало» экспланты от экстремальных условий физических и химических факторов. Меристематические вер-

хушки крыжовника оставались живы в условиях электростатического поля, если на них воздействовали температурой +38°C, контрольные погибли.

Высокие дозы в питательной среде ББАП (5 мг/л) вызвали гибель эксплантов земляники; в условиях электростатического поля они оставались живы.

Экспланты ряда видов на этапе введения в культуру выделяют много фенолов. Учитывая, что фенолы в условиях этиоляции не метаболизируют использовали верхушки побегов подвоя 62-396, полученные в условиях этиоляции при высокой и низкой температуре (табл. 7).

Выгонка побегов при низкой температуре и выращивании в условиях освещенности могло бы быть приемлемой методикой введения в культуру видов, выделяющих мно-

Т а б л и ц а 6

Влияние электростатического поля на рост меристематических верхушек (земляника — сорт Редгонтлит, груша — сорт Лада, среда М.С., экспланты — меристематический купол + примордиальный лист)

Регулятор роста	Земляника			Груша
	живые меристемы, %	листья, шт.	длина, мм	живые меристемы, %
	конт. опыт.	конт. опыт.	конт. опыт.	конт. опыт.
0,2 мг/л ББАП 64 100 2,5 fi. il 4 П 41.0 Я2.!. 6,0 2 7 0 40				

0,2 мг/л култар 100 100 3,0

го фенолов. Однако при всех комбинациях многие экспланты развивали у основания каллус.

Снижение последствий стресса, вызванного поранением и окислением тканей экспланта, возможно при введении в состав питательной среды веществ с антиокислительными свойствами. В опытах с сортом Мелба эффективной оказалась питательная среда с добавлением витамина Е в количестве 0,001 объема среды. Регенерационная спо-

Влияние подготовки эксплантов и условий дальнейшего выращивания на их приживаемость

Условия получения эксплантов	Приживаемость верхушек (%) в условиях	
	этиоляции	освещенности
Этиоляция -2°C	35a	60b
Этиоляция +24°C	15a	45a
Выгонка побегов на свету	25a	40a

способность верхушек в мае на среде с витамином Е повысилась в два раза по сравнению с контролем.

В процессе выделения фенолов и их окисления верхний слой среды загрязнялся продуктами окисления. В этой связи провели испытание нового способа посадки эксплантов. Верхушки сорта Мелба помещали на питательную среду верхней частью, а пробирки ставили таким образом, чтобы не нарушить их полярность. Отсутствие контакта основания экспланта со средой, увеличение площади поглощения компонентов среды стало причиной интенсивного роста и повышения приживаемости эксплантов (табл. 8). Данная методика исключает необходимость частых пересадок на первых пассажах.

Таким образом, этап введения эксплантов в культуру сопровождается двумя событиями: отделение экспланта, что вызывает реакции на поранение (выделение этилена, окисление) и посадка на питательную среду, что приводит к новым корреляционным связям на уровне тканей и органов, изменению в гормональном балансе и энергетике. Эти два процесса взаимосвязаны, зависят от среды и условий выращивания, давая развитие, подобное интактному растению (удли-

нение междоузлий, образование листьев), либо отличное (формирование каллуса, адвентивное образование почек).

Негативные последствия отделения эксплантов можно уменьшить, изменив методику стерилизации. Максимальное увеличение длины побегов земляники отмечено в варианте стерилизации эксплантов $AgNO_3$ совместно с $CuSO_4$. Данный синергизм, очевидно, обусловлен нивелированием действия этилена $AgNO_3$ и уменьшением активности ИУК-оксидазы под влиянием $CuSO_4$ [2].

Опыты, проведенные со многими видами растений, подтверждают важность подбора солевого состава питательной среды. Для успешного размножения состав солей должен быть подобран таким образом, чтобы получить максимум междоузлий на побеге. Данные опытов позволяют рекомендовать среду М.С. для земляники сорта Фестивальная, Заря, среду Ёниге — для сорта Зенга-Зенгана, Редгонтлит, среду Фоссарда — для Зари, Редгонтлит, Фестивальная. Регенерационная способность верхушек крыжовника сорта Русский выше на среде В5 и на половинной среде М.С. с двойным содержанием Са.

Неоднозначная реакция видов на количественный и качественный состав и форму среды предполагает необходимость изменить методику подбора солевого состава. Для этого необходимо было испытать среды, отличающиеся количественным и качественным составом. В качестве объекта исследований были выбраны груша (сорт Лада) и вишня (сорт Апухтинская), которые выращивали на средах М.С., Кноппа, Мак Коуна. Меристематические верхушки груши лучше росли на среде М.С., а вишни — на среде Кноппа. Макро-, микроэлементы,

Т а б л и ц а 8

Влияние способа посадки эксплантов яблони (сорт Мелба) на регенерационную способность *in vitro* (боковые почки — *числитель*, верхушки — *знаменатель*)

Способ посадки верхушек	Кол-во, %	Длина, мм	Кол-во листьев, шт.	Кол-во пассажей
Контроль	22	3,7	1,5	2
	20	4,4		2
Опыт.	97	8,7В	2,5	1
	87	9,3		1

Са, хелат железа этих сред испытывали в комбинациях 1 : 1/2 : 1/3. Для каждой культуры провели испытания 81 варианта солевого состава сред. В опытах с грушей ни одна из комбинаций не оказала ослабляющего действия на рост эксплантов, пять — существенно усилили его (табл. 9).

Наиболее приемлемы среды для груши — № 38 и № 47. В начале они стимулируют рост растяжением, а к концу первого пассажа существенно увеличивают количество листьев и длину экспланта. Сложная реакция эксплантов на солевой состав отмечен в опытах с вишней. Половина сред способствовала существенному изменению интенсивности образования листьев и росту растяжением эксплантов, из них 36 сред влияло положительно, 16 — отрицательно, 18 сред существенно увеличили количество листьев и длину эксплантов. Если в питательной среде макроэлементы представлены рецептурой раствора Кноппа, то увеличение количества листьев и длины экспланта вишни происходило с уменьшением концентрации кальция. Существенное влияние на рост экспланта оказывало уменьшение концентрации хелата железа. Таким образом, наиболее приемлемой средой для вишни на этапе введения в культуру

следует признать среду № 49 (1/2 : 1/3 : 1/2 : 1 среды Кноппа). Уменьшая содержание макроэлементов, мы в первую очередь уменьшаем содержание азота. В этой связи изучали влияние уменьшения азота в среде М.С. при введении в культуру эксплантов земляники сортов Редгонтлит, Зенга-Зенгана. Азот применяли в концентрации 1/2 - 1/8 рецептуры среды М.С. Уменьшение содержания общего азота в среде М.С. на 1/2 было наиболее оптимальным для введения в культуру эксплантов земляники. Уменьшение до 1/6 содержания азота вызывало развитие стекловидности. Известно, что рост и развитие растений зависит не только от общего содержания азота, но и от соотношения аммонийной и нитратной форм. При наличии в питательной среде М.С. только NH_4^+ (5, 10, 20 мМ) приживаемость эксплантов земляники сорта Редгонтлит была максимальной, однако больше половины из них были стекловидными. Если в питательной среде азот был представлен NO_3^- (5, 10, 20 мМ), то приживаемость эксплантов была минимальной. При равном соотношении $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 1 : 1 приживаемость увеличилась с увеличением содержания общего азота. Если в среде превалировал NH_4^+ (2 : 1), то приживаемость уменьшалась с уве-

Т а б л и ц а 9

Влияние солевого состава питательной среды на рост и развитие верхушек груши (сорт Лада, БААП 1 мг/л, ИМК 0,5 мг/л)

№ среды	Состав среды				На 12-й день		На 22-й день		На 34-й день	
	макро-элементы	Са	микро-элементы	хелат Fe	кол-во листьев, шт.	длина, мм	кол-во листьев, шт.	длина, мм	кол-во листьев, шт.	длина, мм
М.С. (контроль)	1	1	1	1	0,7а	4,7а	2а	6а	2,3а	7,3а
42	1/2	1/2	1/2	1/3	2,3б	18б	н.с.	н.с.	н.с.	н.с.
74	1/3	1/3	1	1/2	3,0в	н.с.	7,0б	н.с.	н.с.	н.с.
38	1/2	1/2	1	1/2	н.с.	15,6б	н.с.	16,3б	7,0б	17,3а
47	1/2	1/3	1	1/2	н.с.	9,7а	6,3б	157а	7,3б	20,3б

личением общего азота. Если соотношение NH_4 : NO_3 равно 1:3, то при общем азоте 10 мМ приживаемость была минимальной, если соотношение NH_4 : NO_3 — 3:1, то при общем содержании азота 10 мМ приживаемость была максимальной.

Приживаемость и рост растяжением эксплантов зависит не только от солевого состава питательной среды, но и от регуляторов роста, в основном цитокинов и ауксинов. Часто трудно подобрать оптимальное их соотношение вследствие разнокачественности эксплантов. Поэтому необходим поиск других регуляторов роста, особенно для культур, способных уже на первом этапе образовывать адвентивные побеги. Для этой цели мы испытали сочетание гиббереллина с антигибберелинами — CCC, культиар, пике, которые применяли в диапазоне концентраций ОД-1 мг/л. Все сочетания существенно увеличили длину эксплантов земляники сорта Эстафета. Максимальный рост растяжением отмечен в вариантах 0,1 мг/л гиббереллина + 0,1 мг/л CCC; 0,5 мг/л гиббереллина + ОД мг/л культиара; ОД мг/л гиббереллина + + 0,5 мг/л пике. Длина побегов (без учета длины листьев) увеличилась в 3-4 раза. Некоторые побеги достигли длины 3,5 см, т. е. земляника теряла розеточный габитус. Положительные результаты получены при введении в питательную среду кремнийорганических соединений мивала и крезацина, а также гу-

мата натрия. Во всех вариантах, где присутствовал гумат натрия, у эксплантов развивались трехлопастные листья.

Заключение

Эффективность микроклонального размножения садовых растений зависит от регенирационной способности меристоматических верхушек и может быть увеличена за счет усиления роста растяжением первичного экспланта, уменьшения интенсивности образования каллуса и стекловидности. Сокращение физиологических расстройств на первом этапе возможно при использовании сред, сбалансированных по солевому составу, физических факторов (температура, электростатическое поле), регуляторов роста и методов, уменьшающих отрицательное влияние окислительных процессов на рост эксплантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Веселов И. П.* IV Съезд общества физиологов растений России, 2000. Т. 1. С. 332-333. — 2. *Вонсавичене В. Н. и др.* IX Всесоюзная конференция по проблемам микроэлементов в биологии, 1981. С. 155-157. — 3. *Boxus Ph. et al.* Plant Cell. Tissue and Organ Cult. Berlin (West), 1977. — 4. *Branke M. M. et al.* Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 1989. 19(1). P. 85-89. — 5. *David W. et al.* Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 1989. V. 17. № 3. P. 225-234. — 6. *Ellen Sutter.* J. Am. Hort. Sci., 1988. 113(3). P. 234-238. — 7. *Gront B. W.* Acta Horticulture, 1988. № 230. P. 129-135.

В ближайших выпусках журнала будет продолжение публикации данного материала¹

*Статья поступила
16 декабря 2004 г.*

SUMMARY

In this article some data on longterm experiments with introduction of great number of plant varieties into culture are given. The importance of the impact on explants of temperature, electrostatic field defoliation and etiolation is represented. The selection methods of media salt composition are given, also the necessity of using gibberellins as growth regulators together with CCC; silicon organic compounds and sodium humate is shown.