

УДК 631.533:631.543

УКОРЕНЕНИЕ — КЛЮЧЕВОЙ ЭТАП РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ IN VITRO

В.И. ДЕМЕНКО, К.А. ШЕСТИБРАТОВ, В.Г. ЛЕБЕДЕВ

(Кафедра плодоводства)

В статье представлены результаты многолетних исследований о влиянии различных регуляторов роста, углеводов, длительности пассирования, качества агара, структуры среды, солевого состава питательной среды на корнеобразование. Обсуждаются этапы ризогенеза и их продолжительность. Особое внимание уделено проблеме этиоляции, физическим факторам, гормональному и солевому составу питательной среды. Содержатся важные и достоверные сведения о влиянии света, состава среды на ризогенез, жизнедеятельность растений и нестерильных условиях.

Ключевые слова: in vitro, регуляторы роста, питательная среда, ювенильность, этиоляция, углеводы, земляника, яблоня, груша, сирень, роза, актинидия китайская, ясень обыкновенный.

Процесс корнеобразования — это серия различных биохимических, физиологических и гистологических событий. Близость к сосудистым тканям предрасполагает клетки закладывать корневые примордии [4]. Место заложения корней влияет на жизнеспособность укорененных растений, особенно полученных in vitro. Можно получить 100% укоренение in vitro и 100% гибель растений в нестерильных условиях [26]. При любых способах укоренения процесс адвентивного корнеобразования проходит 3~4 этапа: индукция, инициация, появление корней за пределами стеблевой части черенка [3]. Продолжительность первых двух этапов 10^с 15 дней, за этот период предкомпетентные клетки приобретают способность регенерировать меристематические очаги, в них начинается синтез корнеспецифических белков [13].

Появление корней зависит от генома растений и условий укоренения.

Одна из особенностей размножения растений in vitro — ювенилизация тканей, что является причиной легкости ризогенеза in vitro [19]. Степень ее проявления зависит от условий культивирования, и в первую очередь от содержания в сосудах этилена [25].

Предпосылкой для начала корнеобразования при любых способах размножения является этиоляция. Причина влияния этого феномена связана с анатомическими и биохимическими изменениями, а также с ювенилизацией тканей. У этиолированных черенков выделены белки-рецепторы, обладающие высоким сродством с ауксином. В темноте большая часть ауксина связана с белками [17]. Этиоляция повышает активность пероксидазы, ПУК — оксидазы в тканях, что уско-

ряет начало образования корней. Она усиливает чувствительность тканей к экзогенному ауксину, давая возможность использовать меньшие концентрации. Характер действия этиоляции *in vitro* зависит от вида растений и имеет пролонгирующий эффект [23]. Укоренение *in vitro* происходит при освещении всего черенка, что сказывается на ризогенезе и частично может нивелироваться ИМК, которая в меньшей степени стимулирует синтез этилена по сравнению с ИУК [20]. Основная проблема успешного ризогенеза *in vitro* заключается в трудности разделения момента заложения первого корневого примordia с началом синтеза этилена. При этом очень высокий или очень низкий уровень этилена отрицательно влияет на укоренение [7]. Свет выполняет важную роль в регулировании морфогенетических процессов. Облучение уже образовавшихся корней светом подавляет удлинение корней на 40~50%, за счет 4-кратного увеличения содержания этилена [14]. Для трудно укореняемых видов рекомендуют использовать темновой период на начальном этапе укоренения. Его продолжительность зависит от культуры и колеблется от 3~5 дней до 4 недель. Ряд авторов отмечают сложную зависимость укоренения от светового режима, регуляторов роста, pH среды [15, 22]. Положительное действие этиоляции на этапе пролиферации побегов зависит от сорта. Применение ауксинов и темноты на последней неделе пролиферации побегов M2 7 уменьшало укореняемость на 65% [6].

Действие ферментативных систем, которые катализируют разрушение ИУК, осуществляется только в присутствии кислорода. Питательные среды, применяемые для укоренения побегов *in vitro*, содержат очень мало кислорода, что не способствует развитию корневых волосков.

Поэтому подходы к укоренению *in vitro* должны отличаться от уко-

рнения *in vivo*. Современное промышленное размножение растений *in vitro* невозможно без использования регуляторов роста. Как правило, для укоренения используют аналоги ИУК. Отношение к экзогенному ауксину, времени и способу его применения *in vitro* неоднозначно. Достаточное количество заложившихся корней и хорошая приживаемость растений в нестерильных условиях получены при экспозиции 7 дней на среде с ауксином. Более длительное воздействие приводит к образованию каллуса [18]. Побеги легкоукореняемых культур можно укоренять на средах без ауксинов. Однако ауксины часто не являются лимитирующим фактором и для трудно укореняемых видов.

Кроме веществ из группы ауксинов отмечают стимулирующее влияние ретардантов на укоренение и характер развития корней [1, 16]. Некоторые из них активируют транспорт ИУК, углеводов к базальной части черенка. Методика укоренения *in vitro* позволяет контролировать физические факторы, гормональный и солевой состав питательной среды. В то же время освещение основания побега, длительное воздействие ауксином, разнокачественность побегов, незначительный замкнутый объем, отсутствие или недостаточно интенсивный газовый обмен, его специфичность, недостаточное содержание кислорода в зоне укоренения, возможная латентная стекловидность побегов, отсутствие транспирации, фотосинтеза и воздействия ультрафиолетовой радиации создают проблемы для укоренения и последующей приживаемости растений в нестерильных условиях. Оптимизация этих факторов и их взаимодействия являются основной задачей исследований ризогенеза *in vitro*. В подавляющем большинстве опытов по укоренению *in vitro* исследователи отмечают важность осмотического потенциала среды, который зависит от концентрации

сахарозы, солевого состава, особенно азота и калия [9]. Как правило, минеральный состав среды М.С. уменьшают в 2~8 раз или заменяют на среду Уайта [8]. При этом ведущая роль отводится содержанию нитратного и аммиачного азота [21]. Отсутствие той или иной формы азота отрицательно влияет на укоренение побегов [24].

Пригодные для укоренения побеги плодовых культур формируются только после длительного культивирования. Даже на 11-14-м пассаже укоренение трудноукореняемых видов растений представляет серьезную проблему [2]. Однако очень длительное пассирование нежелательно, особенно для видов, вегетативное потомство которых предназначено для многолетних насаждений.

Считается перспективным укоренение побегов, полученных *in vitro*, в стерильных субстратах при повышенной влажности либо в атмосфере искусственного тумана [10]. По способности к укоренению *in vitro* в научной литературе представлен широкий диапазон данных — от легко укореняемых видов (земляники) до отсутствия укоренения (груша каллариана) [11]. Поэтому неудивительно, что многие авторы считают успешное укоренение побегов *in vitro* ключевым этапом микроклонального размножения [5].

Материалы и методика

Способность к укоренению *in vitro* земляники, яблони, груши, сирени, роз, актинидии китайской, ясеня обыкновенного изучали: с использованием различных регуляторов роста (ПУК, ИМК, НУК, культиар, мивал, крезацин, гуamat натрия, азотнокислое серебро); углеводов (сахароза, глюкоза, мальтоза, фруктоза, сорбит, маннит); ПАВ (твин-40, КЭП); влияния длительности пассирования и качества побегов, агара и его заменителей, структуры среды и воздействия физических факторов, солевого состава питательной среды. Расте-

ния выращивали по общепринятым методикам с учетом специфики этапа укоренения. Учитывали начало корнеобразования, развитие каллуса, количество корней, рост побега. В каждом варианте по 10—14 растений в четырех повторностях.

Результаты и их обсуждение

Способность боковых побегов к укоренению *in vitro* во многом определяет эффективность технологии микроклонального размножения. Это наиболее затратная статья (75% затрат ручного труда) в стоимости конечной продукции. Успешное прохождение этапа ризогенеза зависело от культуры, сорта, условий этапа пролиферации, солевого и гормонального состава среды, количества пассажей. Только побеги земляники были способны к укоренению на первом пассаже, а робинии и вейгелы на втором пассаже. Укоренение земляники зависело от солевого состава среды и ее формы. Среда Фоссарда лучше подходит для укоренения земляники. Корневая система на этой среде отличалась сильным ростом, была окрашена и имела боковые корни. Растения на среде Фоссарда были развиты сильнее, имели 4~5 листьев темно-зеленого цвета. Развитие каллуса отсутствовало. Менее концентрированные среды уменьшали укореняемость и угнетали развитие корневой системы.

Среда М.С. стимулировала укоренение и развитие каллуса у основания побега, а наличие каллуса нежелательно, так как при пересадке растений в нестерильные условия они погибают от ботритиса, фузариоза и питиума. Сокращение в среде М.С. макроэлементов или азота на 1/2 или 4/5 увеличивало укоренение практически всех изучаемых культур, а корнеобразование происходило при более низких концентрациях ауксина. На полной среде М.С., содержащей 0,5 мг/л ИМК, развивались толстые, короткие корни. На бедных средах

корни были нитевидные и развивались из основания побега.

Характер развития корневой системы зависел от типа регулятора роста, индуцирующего корнеобразования. Стимулирующее влияние ИМК и ИУК в опытах с земляникой в большей мере проявилось на твердых средах, а НУК — на жидкой. Более мощная корневая система образовалась на жидкой среде, содержащей НУК. Однако развитие надземной системы не происходило, что связано со способностью НУК поглощаться и перемещаться по растительным тканям. На всех средах отмечено интенсивное развитие каллуса, особенно на средах с НУК. С учетом недостатков ауксина на этапе укоренения *in vitro* необходим поиск других веществ, которые стимулировали бы быстрое развитие корневой и засухоустойчивость надземной систем. Из литературных источников известно, что такими свойствами обладает культиар, который хорошо себя зарекомендовал на интактных растениях при зеленом черенковании (табл. 1).

Т а б л и ц а 1
Влияние культиара
на укоренение земляники *in vitro*
(среда 1/2 М.С., сорт Холлидей)

Культиар, мг/л	Укоренение, %
0	50 б
0,3	100 в
0,5	100 в
0,7	44,3 б
0,9	10 а
1,0	10 а
2	0 а

С увеличением концентрации культиара в среде происходило ингибирование роста надземной и корневой системы, которые отличались интенсивным радиальным ростом. Использование культиара в диапазоне концентраций 0,3~0,5 мг/л также ингибировало раз-

витие надземной системы, однако в меньшей степени. Развитие каллуса не отмечали ни в одном из вариантов. Концентрация культиара свыше 1 мг/л вызывала гибель побегов. Укоренение побегов *in vitro* возможно только при определенной их длине. Ни одно из испытанных веществ не способствовало развитию корней непосредственно из меристематической верхушки, т.е. в начале необходим рост растяжением, а затем начинают развиваться корни. Введение в среду культиара (0,1 ~0,2 мг/л) полностью ингибировало рост растяжением меристематических верхушек и вызывало развитие у них корневой системы. Часть корней была окрашена в зеленый цвет, т.е. корневая система приняла на себя функцию фотосинтезирующего органа при отсутствии роста надземной системы. Культиар в концентрации 0,5 мг/л стимулировал развитие корней второго, а в некоторых случаях — третьего порядка у сирени.

С целью устранения отрицательного влияния ауксинов на процесс корнеобразования *in vitro* испытывали вещества из группы кремнийорганических соединений (мивал, крезацин, КЭП) и гумат натрия. Применение мивала и крезацина существенно повлияло на укоренение и развитие корневой системы земляники, актинидии китайской, груши. Оптимальные концентрации испытанных веществ находятся в диапазоне 0,1 — 2 мг/л, в котором изменяются все параметры развития корневой системы. Увеличивается процент укоренения, количество корней и их длина (табл. 2).

Укореняемость побегов земляники при сочетании кремнийорганических соединений с другими индукторами корнеобразования зависела от их концентраций. Укоренение ингибировалось полностью, если концентрация мивала и крезацина превышала 2 мг/л в сочетании с ИМК и при совместном их введении в питательную

Влияние регуляторов роста на укоренение земляники *in vitro*
(среда 1/2 М.С., сорт Редгонтлит)

Регулятор роста, мг/л	Укоренение, %	Количество корней, шт.	Длина корней, мм	Каллус, %
Контроль	75	5,4	8,5	0
ИМК 0,2	55	4,9	4,3	53
Культар 0,2	100	8,2	15	0
КЭП 0,5	100	8,02	17,5	0
КЭП 2	100	3,9	11,3	0
КЭП5	65	6,8	7,3	0
Мивал 0,5	90	7,9	16,3	0
Мивал 2	100	9,65	16,3	0
Мивал 5	90	6,4	11,3	0
Крезацин 0,5	100	6,4	12,5	0
Крезацин 2	95	4,9	6	0
КЭП 2 + ИМК 0,2	100	5,1	7,5	10
Мивал 2 + ИМК 0,2	0	0	0	0
Крезацин 2 + ИМК 0,2	0	0	0	0
Культар 0,2 + ИМК 0,2	10	—	20,5	50
КЭП 2 + культар 0,2	15	Очень слабое развитие		
Мивал 2 + культар 0,2	0	0	0	0
Крезацин 2 + культар 0,2	55	3,8	14,3	0
Крезацин 5	100	4,1	15,1	0
НСР ₀₅		2,6	4,7	

среду. Аналогичное влияние совместного применения ИМК с кремнийорганическими соединениями отмечено в опытах с грушей. Стимулирующее влияние крезацина проявляется в более узком диапазоне концентраций (0,1—0,2 мг/л), а мивала при концентрациях 0,1—0,5 мг/л.

Можно предположить, что мивал обладает ауксиноподобным действием, но при этом не стимулирует развитие каллуса. При низких концентрациях мивала и крезацина наблюдается синергизм действия с ИМК на процессы роста и развития земляники *in vitro* — увеличивается высота растения за счет длины побегов и листьев.

Раздельное применение мивала и культара в малых концентрациях способствовало 100% укоренению земляники; совместное использование при больших концентрациях полностью ингибировало корнеобразование. Актинидия китайская в отличие от

земляники максимально увеличивала развитие корней от совместного применения ИМК с мивалом, при этом концентрация ИМК также превышала концентрацию мивала. Совместное действие мивала и крезацина ингибировало укоренение данной культуры. Очевидно, актинидия требует большей концентрации ауксина на этапе индукции по сравнению с земляникой. Потому высокие концентрации ИМК в большей степени стимулировали корнеобразование актинидии, если ее применяли отдельно.

Существенно ускоряли прохождение этапов укоренения побегов земляники гумат натрия и азотнокислое серебро. Их использование в концентрации 0,5-1 мг/л сократило время начала укоренения побегов, ускоряло получение растений, пригодных к пересадке в нестерильные условия. Данные наших опытов с азотнокислым серебром и метионином дают нам основание утверждать, что на первом

этапе укоренения значительный синтез этилена ингибирует заложение корней. Введение в питательную среду метионина полностью подавляло ризогенез в вариантах с ИМК и мивалом и значительно в вариантах совместного действия индукторов корнеобразования. Очевидно, что метионин увеличивает содержание этилена в фазу индукции заложения корней до ингибиторного уровня.

На всех этапах микроклонального размножения в питательных средах используют углеводы, в основном сахарозу, как наиболее мобильный углевод. Углеводы в культуре тканей имеют значение не только как элементы питания, но и как вещества, создающие вместе с солевым составом определенное осмотическое давление. Значение углеводов возрастает на этапе укоренения в связи с необходимостью подготовки растения к автотрофному питанию в нестерильных условиях. Концентрация углеводов сахарозы, фруктозы, глюкозы 10 г/л недостаточна для укоренения земляники. Маннит и сорбит, не имеющие пищевой ценности, но обладающие способностью влиять на осмотическое давление, также не способствовали образованию корней. Появление первых корней на побегах ясеня отмечалось на 9-10-й день после посадки на среду для укоренения. Влияние испытанных углеводов зависело от применяемых регуляторов роста (табл. 3).

Различные углеводы не оказали существенного влияния на частоту уко-

рнения: в варианте с НУК она составила 86-93%, а в варианте с ИМК — 55-71%. Однако количество корней и их длина различались существенно: максимальные значения отмечены на среде с 30 г/л сахарозы или 10 г/л глюкозы. Корни на среде с мальтозой были в 2,4 раза короче, чем на среде с сахарозой, и в 3,2 раза — чем на среде с глюкозой, при этом растения отставали в росте от растений на средах с сахарозой и глюкозой.

Рост и развитие корней *in vitro* зависят от аэрации питательной среды, которая, в свою очередь, зависит от концентрации агара. Укоренение побегов в плотной среде затруднено, развитие корней второго порядка не происходит. С уменьшением концентрации агара существенно увеличивается укоренение побегов и развитие корней второго порядка.

Однако при длительном развитии растений на средах с малым содержанием агара (1,5-2,5 г/л) у них появляются признаки стекловидности. На питательных средах, содержащих даже небольшие концентрации агара, никогда не развиваются корневые волоски, что говорит о недостаточном содержании кислорода. С учетом важности содержания кислорода при заложении и развитии корней и корневых волосков делали попытки заменить агар на этапе укоренения. При использовании полной среды М.С. и заменителей агара побеги погибали уже через несколько дней после посадки. Гибель побегов и растений,

Т а б л и ц а 3

Влияние углеводов и ауксинов на укоренение ясеня, мг/л

Вариант, концентрация, г/л	Укоренение, %		Количество корней на побег		Длина корней, мм, НУК 0,5
	НУК 0,5	ИМК 0,5	НУК 0,5	ИМК 0,5	
Сахароза, 10	92,9	71,4	1,9 аб	1,7	19,1 б
Сахароза, 5	87,5	55,4	1,9 аб	1,3	7,5 в
Сахароза, 30	85,7	69,6	2,3 а	1,8	31,4 а
Глюкоза, 10	87,5	71,4	2,4 а	1,7	25,7 а
Мальтоза, 10	85,7	73,2	1,7 б	1,5	8,1 в

начавших развивать корни на среде 1/2 М.С. и заменителях агара (перлит, песок), была связана с иссушением верхнего слоя субстрата.

Агар стимулировал более раннее корнеобразование. Возможно, он повышает диффузию веществ из питательной среды, а также помогает диффузии веществ из экспланта, ингибирующих корнеобразование. Большая часть укоренившихся побегов в вариантах с заменителями агара прижилась в нестерильных условиях, однако их рост в дальнейшем был слабым. Объединение агара с перлитом способствовало получению хорошо развитой корневой системы земляники, которая обеспечила успешную приживаемость растений в нестерильных условиях. Сочетание перлита с агаром дает возможность уменьшить концентрацию агара в 3 раза. После автоклавирования и застывания среды в сосудах для укоренения образуются два слоя: сверху перлит, пропитанный средой, внизу агаровая среда с вкраплениями частиц перлита (табл. 4).

Т а б л и ц а 4

Влияние соотношения среда : перлит на укоренение и приживаемость разных сортов земляники в нестерильных условиях (среда 1/2 М.С., ИМК 0, 1 мг/л)

Соотношение по объему среда : перлит	Количество укоренившихся, %		Количество прижившихся в нестерильных условиях, %	
	Фестивальная	Зенга-Зенгана	Фестивальная	Зенга-Зенгана
Контроль	80 а	34	39	
0,3:3	85 а			
0,5:1	100 б			
1,0:1,0	100 б	67	64	
1,0:2,0	100 б			
0:1	70 а			

$F_{\phi} > F_{\tau}$ $F_{\phi} > F_{\tau}$

Соотношение перлита и питательной среды с агаром 0,5—1:1 по объему

было оптимальным. Использование такой среды для укоренения груши не дало положительных результатов.

Существующая методика укоренения боковых побегов большого числа видов с использованием ауксинов возможна только после длительного пассирования. Положительное влияние на размножение, возможно, связано с ювенилизацией растительного материала. Не исключена вероятность стимулирующего эффекта этиоляции, так как с увеличением количества пассажей увеличивается количество боковых побегов, основание которых, как правило, этиолировано. Спуровые формы яблони и клонового подвоя 62-396 начали хорошо укореняться с 12-13 пассажа. Укоренение их зависело от солевого состава питательной среды. Укоренение древесных растений на более поздних пассажах создает биологические и организационные проблемы, которые отчасти решаются хранением культур на стадии пролиферации при пониженных температурах. Однако действие этого фактора может иметь отрицательные последствия на укоренение (влияние этиоляции и низких положительных температур). В связи с этим изучали влияние условий освещения на укоренение боковых побегов яблони *in vitro* (табл. 5). Результаты опытов выявили определенную зависимость между влиянием света, низкой температурой, регуляторов роста и укоренением побегов.

При использовании в качестве индуктора корнеобразования ИМК укореняемость побегов повышалась на 14-30%, если пролиферирующие культуры подвергались воздействию темноты, особенно в сочетании с низкими положительными температурами. Отсутствие света на этапе размножения существенно уменьшило укоренение в варианте с культураром и мивалом, особенно в варианте с культураром. Низкие положительные температуры уменьшили ингибиру-

Влияние условий освещения на укоренение боковых побегов яблони in vitro
(среда М.С., 4/5 азота, 10-й пассаж, подвой 62-396)

Способ воздействия светом, регуляторы роста, мг/л	Укоренение, %	Количество корней, шт.
Проллиферирующие культуры 1 мес при t 4°C, укоренение на свету, ИМК 0,5	90	3,4
Культар 0,5	10	0,5
Мивал 1	30	1,3
15 дней в темноте, ИМК 0,5	40	4,4
Культар 0,5	6	0,8
Мивал 1	26	1,4
Проллиферирующие культуры 7 дней при t 24°C в темноте, укоренение на свету, ИМК 0,5	76	4,7
Культар 0,5	0	0
Мивал 1	16	0,8
Укоренение 15 дней в темноте, ИМК 0,5	16	2,7
Культар 0,5	0	0
Мивал 1	20	1,5
Проллиферирующие культуры на свету, укоренение на свету ИМК 0,5	60	4,5
Культар 0,5	70	4,5
Мивал 1	80	5,2
15 дней в темноте, ИМК 0,5	50	4,7
Культар 0,5	30	4,7
Мивал 1	16	1,4
НСР ₀₅	15,4	1,1

ющее действие этиоляции в данных вариантах. Если индукция укоренения (15 дней) проходила в условиях этиоляции, то укоренение уменьшалась на 10–64% в зависимости от индуктора корнеобразования. Как уже отмечалось, в укоренении основную роль играют ауксины, синтезируемые эксплантами. Они необходимы на этапе индукции корнеобразования, который продолжается 6–10 дней. Отсутствие света при

хранении и укоренении стимулирует корнеобразование только в присутствии ИМК.

Сокращение темного периода до 5–10 дней увеличило укореняемость побегов подвоя 62-396 на 24% при использовании ИМК. Хранение конгломератов земляники при низких положительных температурах перед укоренением побегов влияло на скорость прохождения этапов корнеобразования (табл. 6).

Таблица 6

Влияние условий выращивания конгломератов земляники и регуляторов роста на укоренение побегов in vitro (среда 1/2 М.С.)

Условия выращивания, регуляторы роста, мг/л	Укоренение через 6 дней, %	
	Зенит	Редгонтлит
Хранение 2 мес при 2°C, укоренение на свету, ИМК 0,3	26,7 б	—
Культар 0,5	16,7 а	—
Светокомната: укоренение на свету ИМК 0,3	0 а	0 а
Культар 0,5	60 в	74 в

Последствие низких положительных температур зависело от индуктора корнеобразования. ИМК ускорила, а культар тормозил прохождение этапов корнеобразования при таких условиях. Многочисленные опыты по зеленому черенкованию убедительно показывают, что укоренение черенков сильно ингибируется, если их поместить полностью в условия темноты (она необходима только для основания черенка). С учетом такой реакции черенков на отсутствие света мы испытывали различные способы затенения основания побега *in vitro*. Побеги подвоя 62-396 сажали в капсулу из фольги, заполненную питательной средой, или в питательную среду вводили активированный уголь. Наибольший процент укоренения (86%) отмечен в варианте с использованием капсулы. Введение активированного угля в среду уменьшало укоренение на 35%. Известно, что 1 мг активированного угля может поглотить 100 мкг 6БАП и НУК. В активированном угле содержатся феноламиды, что может отрицательно влиять на укоренение. Активированный уголь поглощает этилен, который неоднозначно влияет на процессы ризогенеза. Использование капсулы для укоренения стимулировало интенсивный рост корневой системы в длину, развитие корней второго порядка. Однако использование капсулы не технологично. Нами разработана композиционная среда, которая значительно улучшает укоренение яблони за счет эффекта этиоляции. Отличительной особенностью такой среды от стандартной является размещение на стандартной среде укоренения или размножения слоя среды (2–3 мм), состоящего из воды, агара и активированного угля (2–5%). Композиционная среда способствовала укоренению побегов после 4-го пассажа, увеличению в 2 раза общего числа корней, корней второго порядка и стимулировала ризогенез на средах, содержащих 6БАП. Через

1,5 мес длина укоренившихся побегов на среде, содержащей 6 мг/л 6БАП, увеличилась в 2 раза. Прирост побегов в контроле составлял 27% от опытного варианта. Свет (стандартная среда) ингибировал рост корней в длину и развитие корней второго порядка. На композиционной среде корни развивались между основной средой и затемненным слоем. К концу пассажа на корнях развились корневые волоски. Если стенки сосуда затемняли фольгой, то корневая система развивалась и внутри среды. На основании полученных данных укоренение древесных растений необходимо начинать уже после 4-5-го пассажа. Побеги длиной больше 2,5 см следует использовать для дальнейшего размножения, так как у них отсутствуют предпосылки возникновения стекловидности. Побеги длиной меньше 1,5 см необходимо пересаживать на среду с пониженным содержанием 6БАП (0,1 мг/л), а побеги 1,5—2,5 см — использовать для укоренения.

Жизнеспособность растений в нестерильных условиях во многом определяется способностью растений *in vitro* и *in vivo* к быстрому росту. В условиях *in vitro* это свойство зависит от культуры, регуляторов роста, условий выращивания. Часто на этом этапе отмечается гибель верхушек укорененных растений. В этой связи изучали влияние электростатического поля (10-40 квт/м) на укоренение побегов груши на фоне различных регуляторов роста. Электростатическое поле изменяло характер ризогенеза и рост укорененных побегов. В лучших опытных вариантах количество жизнеспособных побегов было больше на 47,5%, их длина превышала длину контрольных на 17%, увеличилось количество корней и их длина.

Размер боковых побегов влиял и на укоренение их *in vitro*. С увеличением длины боковых побегов увеличивается количество корней, их длина, высота растений и уменьша-

ется количество листьев. Скорость роста надземной системы была выше у побегов длиной 0,5 см. Увеличение количества листьев у побегов небольшого размера, очевидно, связано с остаточным действием ББАП. Не исключено, что небольшой рост побегов объясняется превалированием у них роста делением на этапе пролиферации побегов, которое реализуется увеличением количества листьев на этапе укоренения.

Укореняемость побегов яблони также зависела от их длины. Короткие побеги клонового подвоя 62-396 были способны к укоренению, но развитие надземной и корневой системы было слабым. Эффективным приемом повышения укоренения побегов является травмирование их основания, особенно продольные надрезы побегов. При таком способе на 27% увеличилась укореняемость и в 4 раза — количество корней спуровой формы ялони.

Прохождение основных этапов микрклонального размножения либо невозможно, либо очень затруднено без включения в состав питательной среды регуляторов роста. Для получения желаемой направленности морфогенеза иногда приходится применять их в больших концентрациях, что может вызвать побочные нежелательные реакции (образование каллуса, стекловидности, преждевременную гибель отдельных органов). Вместе с тем известно, что

действие регуляторов роста определяется их способностью проникать в клетку. Ослабить некоторые барьеры проникновения веществ в клетку могут поверхностно-активные вещества (ПАВ). Действие твин-40 зависело от его концентрации, положительное влияние отмечено в вариантах с твин-40 (0,5-1 мг/л). При такой концентрации начало и интенсивность корнеобразования проходили при более низком содержании в среде индукторов корнеобразования (0,1 мг/л ИМК). Более высокие концентрации твин-40 снижали способность побегов земляники к ризогенезу. Более активным в этом процессе был гумат натрия в концентрации 0,5 мг/л.

Получение целостного растения *in vitro* и характер его развития зависели от солевого и гормонального состава среды, предшествующей укоренению.

Процесс корнеобразования боковых побегов роз лучше протекал, если предыдущий пассаж размножения проходил на среде, в которой соотношение $\text{NH}_4 : \text{NO}_3$ было 1 : 2. При таком соотношении существенно увеличилось количество корней и их длина. Высота надземной системы не зависела от соотношения аммиачного и нитратного азота. Укоренение боковых побегов груши зависело от содержания в питательной среде для размножения ББАП (табл. 7).

Несмотря на отсутствие взаимосвязи между концентрацией ББАП

Т а б л и ц а 7

Влияние концентрации ББАП в среде для пролиферации на укоренение побегов груши *in vitro* (среда 1/2 М.С., сорт Лада, 10-й пассаж, 1990)

Концентрация ББАП предыдущего пассажа	Укоренение, %	Количество корней, шт.	Количество растений с живыми верхушками, %	Количество растений с корнями 2-го порядка, %
0,5	70	4,8	72,5 а	26,3 а
1,0	80	4,1	56,2 б	15,0 б
1,5	77,5	4,1	72,5 а	17,6 б
2,0	77,5	4,5	68,7 б	5,0 в
2,5	90	4,7	86,2 а	13,8 б

и последующим укоренением побегов, имеется тенденция ее возрастания с увеличением концентрации ББАП. Уменьшается число растений с погибшими верхушками и ингибируется способность корней первого порядка к ветвлению. Такая реакция груши на ББАП согласуется с его физиологическими свойствами как цитокинина. Изучение качественного состава почек в процессе пассирования земляники показало, что при использовании в питательной среде больших концентраций ББАП (1 мг/л) у всех сортов (Фрагинета, Хавеланд, Заря, Кокинская ранняя, Редгонтлит, сеянец 139-13-11) начиная с 4-5-го пассажа увеличивается количество почек, неспособных к развитию полноценных растений. По-видимому, это связано с длительным воздействием высокой концентрации ББАП.

Агар — наиболее часто используемый гельобразующий материал в культуре ткани. Он наиболее дорогой компонент среды. В связи с этим ведутся поиски заменителей агара, которые обладают гелирующими свойствами. В своих опытах проводили испытание гелрайта*. Использование гелрайта (0,5-2,5 г/л) при укоренении подвоя 62-396 стимулировало развитие стекловидности. Количество стекловидных растений уменьшалось, если гелрайт применяли вместе с агаром (2,5 г/л). Такая реакция растительных тканей, возможно, связана с его способностью поглощать двухвалентные катионы.

Выводы

1. Укоренение побегов земляники возможно на первом, робинии и вейгелы на втором пассаже, яблони и груши после 5-10-го пассажа в зависимости от гормонального и солевого состава среды. Сокращение в среде М.С.

* Гелрайт — самогеллирующий гидроколлоид, представляющий полисахарид, содержащий уроневою кислоту, рамнозу и глюкозу (гелрайт любезно представлен доктором Циммерманом, США).

на 1/2 макроэлементов или на 1/2 -1/3 общего азота способствует увеличению укореняемости побегов земляники и яблони.

2. Характер укоренения побегов *in vitro* зависит от используемых индукторов корнеобразования, их концентраций и сочетаний. При введении в питательную среду гумата натрия, крезацина, мивала, культара существенно увеличилось укоренение, уменьшилось развитие каллуса. Культар способствовал развитию корневой системы непосредственно из меристематической верхушки размером 250-300 мкм, при этом корни были окрашены в зеленый цвет. Применение ПАВ (КЭП, твин-40) повышало активность ИМК в 2 раза и уменьшало активность культара в 6 раз, позволяло проводить этап укоренения при более низких концентрациях ауксинов. Совместное применение ИМК и AgNO_3 ускоряло начало корнеобразования у земляники.

3. Укоренение побегов яблони зависело от способа и продолжительности этиоляции, температурного режима и регуляторов роста. Этиоляция пролиферирующих культур при пониженных температурах в дальнейшем увеличивала укоренение побегов на среде с ИМК и уменьшала — на среде с культаром и мивалом. Композиционная среда способствовала укоренению побегов яблони после 4-го пассажа, увеличению количества корней 2-го порядка, площади листьев, стимулированию развития надземной и корневой системы на среде с 6 БАП (6 мг/л).

4. Структурная среда, состоящая из перлита и агара в соотношении 0,5-1:1 по объему, способствует получению хорошо развитой корневой системы земляники, позволяет уменьшить концентрацию агара в 3 раза.

5. Тип и концентрация углеводов в среде оказывает влияние на характер ризогенеза растений. Наиболее приемлемыми следует признать сахарозу и глюкозу.

Библиографический список

1. Аладина О.Н. Обоснование способов подготовки маточных растений ягодных кустарников к вегетативному размножению: /О.Н. Аладина/ Дис. докт. с.-х. наук: 06.01.07. М., 2004.
2. Катаева Н.В. Особенности микроразмножения трудноукореняемых сортов яблони /Н.В. Катаева // Сельскохозяйственная биология. М., 1986. Вып. 4. С. 18-22.
3. Кефели В.И. Онтогенез. М., 1970.
4. Орлов П.Н. Роль перивискулярных волокон в образовании придаточных корней у зеленых черенков садовых растений // Плодоводство ТСХА, 1985. Вып. 6. С. 102-115.
5. Abbott A.J. Culture of Mallus tissues in vitro multiplication of apples plants from isolated shoot apices // Sci. Horticult, 1976. № 4. P. 183-185.
6. Amitrani A. et al. Influence of the moment of application of IBA and darkness on in vitro rooting of M27 // Agr. Med. Vol, 1989. № 119. P. 417-423.
7. Bartoline G. The effects of regulators of ethylene synthesis on rooting of Olea European L. cuttings // Acta Horticult, 1986. V. 8.
8. Brian C.H., Hicks G. Micropropagation of the Cold-hardy apple rootstock KSC-3 // Can. J. of Plant Sci., 1989. V. 69. № 2. P. 555-564.
9. Cardenas bare. Alicia et al. Potencial osmotica del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagacion in vitro // Rev. fito teen. Mex., 2002. V. 25. № 2. P. 213-217.
10. Chu C.J. Effects of micropropagation techniques on growth and development of miniature roses // Hort. Sci., 1990. V. 25. № 3.
11. Dennis P., Smart et al. In vitro shoot proliferation of Pyrus callieriana from vegetative Buds // Hort. Sci., 1989. V. 24. № 2. P. 298-299.
12. Doolan D.W., Hennerby M.J., Moorgan J.V. Culture of micropropagated strawberry plants in nutrient film technique // Acta. Horticult, 1983. № 133. P. 103-109.
13. Druart P. In vitro promotion of root formation by apply shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases // Z. Pflanzphysiol, 1982. № 1085. P. 429-436.
14. Eliasson I., Bollmark Marie. Ethylene as possible mediator of light-induced inhibition or root growth // Physiol Plant, 1988. V. 72. № 2. P. 605-609.
15. James D. J. et al. The control of rhizogenesis in vitro in difficult-to-root apple rootstocks // Plant tissue culture, 1982. P. 187-198.
16. Geneve R.L. Root Formation in Cuttings of English Ivy treated with Paclobutrazol // Hort. Sci., 1980. V. 25. № 6.
17. Kopcewier I. The influence of red light on auxin level in coleoptiles of etiolated seed - lights in two oat varieties // Interact. Plant Symp. Occas, 1985. V. 175. P. 47-48.
18. Nicholas I.R. The use of fluorescence microscopy to monitor root development in micropropagated explant // J. of Hort. Sci., 1986. V. 61. № 4. P. 417-421.
19. Pliego-Alfaro F.J. Development of in vitro rooting bioassay using juvenile stem cuttings of Persea americana Mill // Hort Sci., 1988. V. 63. № 2. P. 295-301.
20. Raphael Plus. IAA-induced adventitious root formation in green wood cutting of populus tremula and formation 2-indoline-3-acetylserine acid a new metabolite of exogenously applied IAA // Physiol. Plant, 1989. V. 75. P. 86-89.
21. Reiner I. Control of Morphogenesis in Plant Tissue culture by Hormones and Nitrogen Compounds // Plant growth substances, 1970. P. 686-694.
22. Ripley K.P. et al. Micropropagation of Euphorbia lathyris // Plant. Cell Tissue and Organ Culture, 1986. V. 5. № 3. 213-218.

23. *Rugini E. et al.* In vitro control of shoot vortification in almond and development of a technique to Eliminate apex necrosis and shoot base photo-oxidation in pistachio // Hort. Sci., 1986. V. 21. №3.

24. *Scott E.* Sucrose and nitrogen regulation of adventitious root initiation from cultured rose shoot tip // Hort. Sci., 1984. V. 14.

25. *Smith D.L.* Ethylene associated phase change from juvenile to mature phenotype of daylily // Phisiol. Plantarum, 1989. V. 76. P. 466-473.

26. *Takashi Harada et al.* Stades the Morphogenesis of asparagus organ formation in the in vitro culture of segments with a node excited from the shoots seedlings // J. Fac. Agr. Hokkaido Univ, 1983. V. 61. № 3. P. 295-306.

Рецензент — д. с.-х. н. А.В. Исачкин

SUMMARY

Results of a long-term investigation into effect of various growth regulators, carbohydrates, passaging duration, agar quality, medium structure, food solution saline composition on root growth are provided in the article. Both stages and duration of rhyzogenesis questions have been discussed. Much consideration is given to the etiolation problem, physical factors, both hormonal and saline composition of nutrient medium. Both true and important data on light and medium composition influence upon rhyzogenesis and viability of plants under unsterile conditions are given in the article.

Key words: in vitro, growth regulators, nutrient medium, etiolation, carbohydrates, strawberries, apple tree, pear tree, lilac, rose, Chinese actinidia, ash tree.

Деменко Василий Иванович — д. с.-х. н., РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 976-21-98.

Лебедев Вадим Григорьевич — к. б. н., Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Шестибратов Константин Александрович — к. б. н., Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.