УДК 576.35:631.533.1

ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ БОКОВЫХ ПОБЕГОВ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ САДОВЫХ РАСТЕНИЙ

В.И. ДЕМЕНКО, И.А. ПОЗДНЯКОВ

(Кафедра плодоводства)

Сделан анализ второго этапа микроклонального размножения. Показана зависимость его эффективности от содержания азота и соотношения аммиачной и нитратной формы. Выявлены факторы, увеличивающие количество больших побегов.

Степень пролиферации и качество побегов зависит от солевого, гормонального состава среды, условий выращивания, количества пассажей. В конечном счете коэффициент размножения связан с апикальным доминированием. Ранние исследования предполагали, что апекс ингибирует развитие боковых почек вследствие лимитированного снабжения их питанием. Несмотря на то, что эта гипотеза была подтверждена экспериментально, открытие ауксина показало, что он может заменить апекс, т.е. в апикальном доминировании стала превалировать гормональная теория. Однако работы Гордона [1] показали, что апикальное доминирование может контролироваться азотом и фосфором. Таким образом, коэффициент размножения in vitro зависит не только от регуляторов роста, но и от минерального состава среды. При этом основная роль в снятии апикального доминирования отводится цитокининам. Как правило, те сорта и культуры, которые быстро поглощают и быстро разрушают цитокинины, обладают высоким коэффициентом размножения in vitro [3]. Добавление ауксинов улучшает качество побегов. Следует отметить, что эти вещества стимулируют производство этилена [2], чрезмерный синтез которого может вызвать аномальное развитие побегов. Окончательный коэффициент размножения растений in vitro зависит от условий, созданных для роста боковых меристем первичного экспланта.

Условия и методы исследований

Конгломераты культивировали при 16-часовом дне, температуре 23-25°С, освещенности 3000-3500 лк. Деление конгломератов проводили после 3-го пассажа. Продолжительность пассажа — 3-4 недели. Культуры хранили в бытовом холодильнике при температуре 2~4°С. Электростатическое поле создавали генератором высокого напряжения 524 В. Интенсивность выделения этилена эксплантами груши определяли методом газожидкостной хроматографии.

Результаты исследований

Способность экспланта к пролиферации зависела от предварительного воздействия на него. Обработка низкими положительными температурами эксплантов земляники, актинидии увеличивала их приживаемость и количество боковых побегов, что, возможно, связано с аккумулированием предшественника ауксина в почках [4]. На этапе пролиферации экспланты актинидии развивали большие листья, кото-

рые поднимали эксплант над средой, что уменьшало коэффициент размножения. Удаление листьев и размещение побегов горизонтально стимулировало развитие боковых побегов и их рост.

При отделении экспланта от маточного растения сохраняются некоторое время коррелятивные связи между примордиальными листьями и пазушными меристемами экспланта. Прорастание их в побеги зависело от места взятия эксплантов и наличия примордиальных листьев (табл. 1).

Таблица 1

Влияние типа экспланта и наличия листьев на пролиферацию боковых побегов земляники (среда М.С., 6 БАП 0,3 мг/л, сорт Гренада, 1985 г.)

Тип экспланта	Количество боковых побегов, шт.	Приживаемость, %
Верхушки усов 500 мкм, без листьев	2,6	75
Верхушки усов 500 мкм, с листьями	5,2	80
Почка первого междоузлия уса без листьев	3,5	78
Почка первого междоузлия с листьями	4,1	100
$НСР_{05}$	1,3	

Удаление листьев уменьшало приживаемость верхушек побегов земляники и их пролиферацию на 1-м пассаже. Аналогичные результаты получены в опытах с крыжовником. Электростатичское поле стимулировало развитие боковых побегов только у земляники на средах с высоким содержанием 6БАП (5 мг/л) за счет развития адвентивных побегов.

Этот вывод подтверждается данными, которые получены нами в опытах с использованием цветоложа земляники. В контроле цветоложе развивалось в ягоду, а в условиях электростатического поля — в конгломерат побегов.

Пролиферация боковых побегов земляники зависела от состава и формы питательной среды. На среде Мюллена отмечена массовая гибель эксплантов. Среда Енига стимулировала рост в длину центрального побега, что угнетало развитие боковых. Среда Фоссарда способствовала образованию конгломерата без ярко выраженного лидера и в отличие от среды М.С. не вызывала развитие каллуса. Максимальное число боковых побегов получено на твердых средах М.С. и Фоссарда. Среда М.С. отличается от других сред в первую очередь содержанием азота. При уменьшении концентрации азота и увеличении кальция в среде М.С. в 2 раза повышалось побегообразовательная способность земляники, особенно в сосудах небольшого объема.

Пролиферация боковых побегов земляники и розы зависела от соотношения аммиачной и нитратной формы азота.

Таким образом, 2-й этап микроклонального размножения земляники следует проводить на модифицированной среде М.С. с общей концентрацией азота 20 мМ при соотношении NH_4: NO_s 1:2. В этом случае признаки стекловидности отсутствовали (табл. 2).

Па среде М.С. экспланты розы развивались толстые, короткие боковые побеги. Больше половины из них были с признаками стекловидности. Существенное уменьшение содержания азота в питательной среде ухудшало качество побегов роз. Максимальный коэффициент размножения получен на средах, с содержанием азота 10,3-13,7 мМ. Концентрацию кальция необходимо рассчитывать с учетом сортовой реакции (табл. 3).

Рост эксплантов роз и их пролиферация зависели от соотношения NH_4: $N0_3$ (табл. 4).

При добавлении в среду NH_4C1 лучшее развитие конгломерата отмечено в варианте NH_4 : $N0_3$ 1 : 2, а при использовании $(NH_4)_2$ $S0_4$ — 1:3. Побегообразовательная способность земляники зависела от концентрации 6 БАП и состава питательной среды предыдущего пассажа. Отсутствие регуляторов роста в средах 1-го пассажа существенно сказалось на побегообразо-

Таблица 2

Влияние концентрации общего азота и соотношения NH_4:$N0_3$ на рост и развитие конгломератов земляники

(среда М.С., 6 БАП 0,3 мг/л, ИМК 0,2 мг/л, ГКЗ 0,1 мг/л, сорт Редгонтлит, 1986 г.)

Содержание общего азота, мМ	Количество листьев, шт.	Количество боковых побегов, шт.	Развитие конгломерата
	соотношение NH_4 : NO_3, мМ		
	1 : 0		Очень слабое, стекловидность, красного цвета
5	0	0	
10	0	0	
20	0	0	
	0 : 1		Превалирует развитие листьев, боковые побеги малого размера
5	39	2,4	
10	20	5	
20	13	0	
	1 : 1		Листья красного цвета, с увеличением дозы азота рост побегов увеличивается
5	5	0	
10	3	4	
20	8	20	
	2 : 1		Листья красного цвета, новые не образуются
5	0	0	
10	4	1	
20	6	0	
	3 : 1		Окончания листьев красного цвета, с увеличением дозы азота их рост улучшается
5	10	1	
10	16	1	
20	23	2	
	1 : 2		С увеличением дозы азота длина боковых побегов равна длине центрального побега
5	17	7	
10	9	13	
20	35	38	
	1 : 3		Сильное развитие центрального побега
5	23	2	
10	29	0	
20	17	3	

Таблица 3

Влияние солевого состава среды на развитие боковых побегов у розы (среда М.С., 6 БАП 2 мг/л, НУК 0,004 мг/л, 1987 г.)

Среда	Сорт		
	Эдельвейс	Мерседес	Треверлюнде
	количество боковых побегов, шт.		
1 Ca	9,6	2,6	9
2 Ca	12,0	3,6	9
N 6,7мМ+1 Ca	10,3	3,0	5,3
N 6,7мМ+2 Ca	8		9
N10,3мМ+1 Ca	12	8,6	9,3
N 10,3мМ+2 Ca	12	11	9,3
N 13,7мМ+1 Ca	15	7,3	11
N13,7мМ+ 2 Ca	8,6		14,3
$НСР_{05}$	2,6	1,5	1,1

Таблица 4

Влияние соотношения NH_4:$N0_3$ на рост и развитие эксплантов роз (среда модифицированная для роз, в среднем по сортам Литл Бакара, Нью Даун, Соня, Фламинго, Эйфелева башня, 2001-2004 гг.)

NH_4:NO_3	Приживаемость, %	Количество боковых побегов, шт.	Длина побегов, см
1:1	88	2,8	2,14
2:1	46	3,0	1,46
3:1	30	3,1	1,68
1:2	98	3,1	2,5
1:3	100	3,1	2,32

нательной способности (табл. 5). Если принять во внимание, что на 2-м пассаже использовали отдельные побеги, то можно предположить, что даже не-

Таблица 5

Влияние концентрации 6 БАП и гормонального состава предыдущего пассажа на побегообразовательную способность земляники (среда модифицированная М.С., элитные сеянцы НИЗИСНП, количество боковых побегов шт., 1983 г.)

Концентрация 6 БАП, мг/л	Гормональный состав предыдущего пассажа, мг/л					
	без регуляторов роста	6 БАП 0,06	без регуляторов роста	6 БАП 0,06	без регуляторов роста	6 БАП 0,06
	гибриды					
	118/1620		172/1450		37/2920	
0,2	11	19	10	13	8	13
1,0	22	27	26	28	20	26
2,5	29	35	35	43	20	28

большие концентрации 6 БАП 1-го пассажа могут создать предпосылки для развития адвентивных побегов.

Побегообразовательная способность эксплантов земляники была в 2 раза выше, если в среде 1-го пассажа применяли нуклеопептиды.

Начало пролиферации боковых побегов яблони зависело от гибридной формы. Спуровые формы яблони, отличающиеся хорошей регенерацией на 1-м пассаже, достигали максимального коэффициента размножения к 2-5-му, плохо вводимые в культуру — к 7-му пассажу. Способность к длительному размножению также зависела от гибридной семьи. Спуровая форма 269 продуцировала боковые побеги в течение 14 пассажей, остальные — в течение 10-13, после чего наступала гибель культур (табл. 6).

Если после 9-10-го пассажа пролиферирующие культуры подвергали воздействию низкими положительными температурами (2~4°С) в течение 4~5 недель и уменьшали концентрацию 6 БАП до 0,01-0,1 мг/л, то число продуктивных пассажей увеличивалось.

Известно, что укоренение боковых побегов in vitro зависит от культуры,

Таблица 6

Интенсивность развития боковых побегов различными спуровыми формами яблони in vitro (среда М.С. 6 БАП 2 мг/л, 1988-1989 гг.)

Номер пассажа	Количество боковых побегов, шт.						
	гибридная семья						
	267/29	267/30	267/26	268	273	269	275
1	4,0	1	4	1	1	3	1
2	9,8	6,0	15,4	4,0	3,0	21,3	3,0
3	5,2	11,4	11,2	3,5	4,0	7,6	6,0
4	5,5	18,1	11,0	4,9	2,2	7,7	6,0
5	4,7	24,1	14,0	6,1	2,3	8,8	5,3
6	11,4	16,3	8,6	9,8	3,0	11,6	8,6
7	13,0	16,3	7,8	5,4	6,5	14,5	8,7
8	12,5	23,23	9,7	3,2	5,8	10,9	8,4
9	12,6	15,1	9,8	9,6	7,4	7,7	7,4
10	6,3	11,4	8,8	5,3	5,6	11,5	7,2
11	4,7			7,8	9,6	7,1	
12					6,9	9,2	
13					6,6	6,9	
14						5,9	
15	—	—	—	—	—	—	—
В среднем	8,6	15,8	9,5	6,0	5,4	10,1	6,4
$НСР_{05}$	2,3	3,7	3,8	1,5	1,3	1,6	1,3

сорта, состава питательной среды, особенно от числа пассажей и длины боковых побегов. Боковые побеги хорошо укореняются, если их длина более 1,5 см. Выход больших побегов зависел от способности спуровых форм яблони к пролиферации. Доля длинных побегов существенно уменьшилась на 10 м пассаже у форм с большим коэффициентом размножения. Слабо пролиферирующие спуры образовывали большие побеги стабильно на протяжении всего периода культивирования. У подвоя 62-396 развитие больших побегов продолжалось в течение 14 пассажей (табл. 7). Следует отметить положительную корреляцию между общим числом боковых побегов и развитием длинных побегов у спуровых форм 269,273 (коэффициент корреляции 0,93; 0,74). Для остальных форм такая корреляция отсутствовала. С увеличением количества пассажей уменьшался коэффициент размножения, увеличивалась доля небольших побегов, наступала гибель пролиферирующих культур.

Количество длинных побегов у яблони й груши увеличивалось в условиях электростатического поля.

Использование питательной среды, содержащей 1 мг/л ГКЗ и 0,1 мг/л ССС

Таблица 7

Влияние продолжительности культивирования на выход побегов яблони, пригодных для укоренения
(1988-1989 гг.)

Номер пассажа	Количество побегов > 1,5 см, %		
	спуровая форма 273	спуровая форма 269	подвой 62-396
3	100	41	49,7
4	100	45,3	47,6
5	100	47,3	45,0
6	100	53,4	37,1
7	44,4	49,2	30,3
8	52,1	45,8	38,9
9	45,6	42,9	47,3
10	43,7	36,0	42,4
11	48,8	39,3	39,0
12	49,0	39,9	40,1
13	46,9	46,6	36,0
14			34,7

перед укоренением побегов земляники, стимулировало рост растяжением более 80% побегов и они достигали длины 1 — 1,5 см. Если конгломерат помещали на среду, содержащую 0,5 — 1 мг/л культара, то через месяц боковые побеги разделялись простым нажатием иглой. Оба способа облегчают и ускоряют этап пересадки побегов на укоренение.

Побегообразовательная способность вишни сорта Любская и подвоя ПЗ превосходила яблоню и особенно грушу. Уже на 3-4-м пассаже коэффициент размножения вишни достигал 1:30, а подвоя ПЗ — 1:70. Данная особенность косточковых культур объясняется их способностью развивать in vivo несколько генераций пазушных меристем за вегетацию.

В процессе микроклонального размножения может возникнуть физиологическое расстройство — стекловидность эксплантов. У одних растений (черешня, облепиха, лещина) в наших опытах она проявлялась уже на 1-м пассаже, у других (робиния, подвой ПЗ) — крайне редко. Коэффициент размножения стекловидных культур был существенно меньше. Ненормальная структура листьев и побегов может быть следствием потери транспортной полярности ауксина, что, в свою очередь, может быть обусловлено интенсивным синтезом эксплантами этилена. Стекловидные культуры груши выделяли в 6 раз больше этилена, чем нормальные (0,9 нл/ч).

Большинство авторов ставили перед собой задачу получить максимальный коэффициент размножения на каждом пассаже. Это было оправдано, когда в качестве сосудов для размножения использовали пробирки. В настоящее время более удобными для работы следует признать колбы и банки объемом 100-200 мл.

Эффективность размножения при этом определяется не коэффициентом размножения единичного экспланта, а количеством боковых побегов, образо-

вавшихся в сосуде. Общий выход боковых побегов у земляники не зависел от количества эксплантов в сосуде.

Однако качество побегов было лучше на средах с небольшим содержанием 6 БАП (табл. 8).

Таблица 8

Влияние плотности посадки конгломератов и концентрации 6 БАП на пролиферацию побегов и их качество (среда М.С., сорт Редгонтлит, 2001 г.)

Концентрация 6 БАП, мг/л	Количество конгломератов в сосуде, шт.	Количество боковых побегов, шт.				Стекловидность, %
		всего	побегов >0,5 см	побегов <0,5 см	конгломератов с корнями, %	
1,0	2	120	44	76	5,6	25
0,3	4	112	84	28	5,3	0,3
		Fф<Fт	Fф>Fт	Fф>Fт	Fф>Fт	

Заключение

Эффективность 2-го этапа микроклонального размножения садовых растений зависит от условий, обеспечивающих получение конгломератов, развивших 10-15 побегов перед укоренением. Побеги длиной более 2,5 см необходимо использовать для дальнейшего размножения, длиной меньше 1,5 см — пересаживать на среду с пониженным содержанием 6 БАП, а побеги 1,5-2,5 см — использовать для укоренения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gordon J.* // Intergration of activity in the higher plant, 1977. P. 251-273. — 2. *Dijck R.* // Plant Physiology, 1988. V. 86. № 3. P. 836-840. — 3. *Marino G. II* Acta Horticult, 1986. V. 179. P. 871 — 872. — 4. *Schuyler Suley.* // Hort. Sci., 1990. V. 25. № 11. P. 1303-1365.

SUMMARY

The analysis of the second stage of microclonal propagation was carried out. The dependence between its effectiveness and nitrogen content and correlation between ammonium and nitrate forms was shown. The factors increasing the number of large shoots were revealed.