

УДК 634.23:57.082.26

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ВИШНИ

В. В. ФАУСТОВ, Е. В. ОЛЕШКО, И. В. ЖАРКОВА,
З. М. АСАДУЛАЕВ, Х. В. ШАРАФУТДИНОВ, Х. ИСМАИЛ
(Кафедра плодоводства)

Изучали микрочлональное размножение (верхушечными меристемами) перспективных сортов и клоновых подвоев вишни на искусственных питательных средах в стерильных условиях. Для многих сортов характерны высокая митотическая активность апекса, что способствует формированию разветвленного конгломерата почек и боковых микропобегов. Генетическая стабильность получаемого таким образом посадочного материала базируется на митотической активности апекса микрочеренка и функциональной работе камбия, а направленность органогенного развития основных вегетативных органов (побегов и корней) регулируется экзогенными фитогормонами.

С развитием в нашей стране биотехнологических исследований микрочлональное размножение многих плодовых и декоративных растений на основе верхушечных меристем находит применение в практике сельскохозяйственного производства, хотя и в ограниченных масштабах. В плодоводстве этот метод получил большее распространение из-за необходимости освобождения районированных и перспективных сортов и клоновых подвоев семечковых, косточковых и ягодных культур от патогенных микроорганизмов и опасных возбудителей болезней, включая вирусные и микоплазменные [8, 18]. Вторым положительным моментом микрочлонального размножения являются, по мнению отдельных исследователей [2, 17], возможность достижения высоких коэффициентов размножения и одновременно сокращения сроков получения здорового посадочного материала, особенно при его выращивании в течение всего календарного года в регулируемых факторостатных условиях, а также применимость этого способа в селекционном процессе с целью его ускорения [24].

Однако широкое распространение и внедрение в практику питомниководства микрочлонального размножения тормозится из-за недостаточной изученности многих вопросов, связанных с культивированием изолированных меристем в стерильных условиях на искусственных питательных средах [4, 6]. Серьезным сдерживающим моментом является также отсутствие апробированных и технологически достаточно надежных способов индукции пролиферации пазушных и верхушечных меристем на этапе микроразмножения, последующего укоренения микропобегов и затем перенесения их в нестерильные условия для дорастивания и получения стандартного посадочного материала. Следует также подчеркнуть, что до настоящего времени в нашей стране и за рубежом отсутствуют обобщающие работы прикладного характера, не выдвинуты общепризнанные гипотезы о направленности органогенных процессов, в совокупности приводящих к образованию из изолированных апикальных меристем целостных растительных организмов [7, 36]. Применительно к культуре вишни имеются лишь фрагментарные исследования [26, 27] микрочлонального размножения сортов и перспективных клоновых подвоев, что и определило цель и специфику выполнения настоящей работы.

Методика

Эксперименты проводили в 1981—1987 г. ской академии и в лаборатории культуры на Плодовой опытной станции Тимирязев- изолированных тканей и органов отдела

Таблица 1

Коэффициент размножения
эксплантатов вишни (число микропобегов
в расчете на 1 эксплантат)
в зависимости от минерального состава
питательной Среды (НСР₀ⁱ 2,8)

Питательная среда	Подвой П-3	Подвой П-7	Сорт Влада-мирская	Среднее значение
Готре	2,1	1,5	1,9	1,8
Уайта	2,2	2,5	2,6	2,4
Хеллера	1,8	1,6	1,7	1,7
Мурасиге — Скуга	14,2	25,2	28,9	22,8

питомниководства зонального НИИ садоводства Нечерноземной полосы (Бирюлево Московской обл.). Основные объекты изучения — сорта вишни Шубинка, Любская, Владимирская, Обланинская, Молодежная, Гриот московский, Черноокая и клоновые подвои этой породы ВР-1 селекции А. Ф. Колесниковой [19], П-3 и П-7 селекции А. М. Михеева [34], считающиеся перспективными для условий Нечерноземной зоны РСФСР [10]. В качестве материнских были использованы растения из коллекционных насаждений вишни Плодовой опытной станции ТСХА и НИЗИСНП.

Для получения эксплантатов с однолетнего прироста прошлого года или растущих побегов срезали распускающиеся боковые вегетативные почки с участком стебля и верхние части побегов длиной до 1 см, у которых удаляли поверхностные чешуи и формирующиеся молодые листья. Затем поверхность стерилизовали этот растительный материал в 0,1% водном растворе сулемы в течение 7 мин и 3-кратно обильно промывали стерильной выдистиллированной водой. Эксплантаты вычленили в асептических условиях в бокс-комнате под бинокулярным микроскопом МБС-1 при 30—40-кратном увеличении с помощью препаровальных игл и микроскальпеля. Эксплантаты представляли собой апикальную меристему с 2—3 примордиальными листьями и субапикальной частью побега длиной 200—500 мкм. Такие эксплантаты в соответствии с общепринятой в биотехнологии терминологией принято называть верхушечными меристемами (критический анализ терминов по микроклональному размножению дан во многих работах, в частности в [7, 17, 22]). Сразу после вычленения эксплантаты высаживали на стерильную питательную среду в пробирки или стеклянные бюксы в бокс-комнате с ламинарным притоком воздуха и затем их плотно закрывали стерильными тампонами.

Этапы микроклонального размножения вишни

Единый процесс микроклонального размножения вишни верхушечными меристемами условно можно разделить на 3 периода: введение эксплантатов в культуру и их развитие на искусственных питательных средах; пролиферация эксплантатов — формирование конгломерата боковых микропобегов и пазушных почек; укоренение выросших на среде

На первых этапах нами были испытаны питательные среды, предложенные в основном для травянистых растений Готре [49], Уайтом [51], Хеллером [22] и Мурасиге и Скугом [50]. Эти среды различаются по минеральному составу, но имеют одинаковый набор органических и физиологически активных компонентов. Лучшее развитие эксплантатов вишни наблюдалось на модифицированной среде Мурасиге и Скуга (табл. 1). В этом варианте сформировались крупные конгломераты, состоящие из морфологически развитых побегов с оформленными листьями и пазушными почками. Необходимо также подчеркнуть, что характерной особенностью развития эксплантатов на средах Готре, Уайта и Хеллера явилась пролиферация (размножение) только тех меристем, которые имелись в пазухах примордиальных листьев. Соответственно заложения и затем развития новых пазушных меристем у эксплантатов, культивируемых на этих средах, не отмечалось.

Среда Мурасиге и Скуга послужила основной средой, применявшейся нами в следующих опытах. Органические вещества, включая и синтетические регуляторы роста, вводили в ее состав в следующих концентрациях: сахароза — 2—3%, агар-агар — 0,4—0,7%, тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота — по 0,5, аскорбиновая кислота — 1 мг/л. Актуальную кислотность питательной среды перед стерилизацией в автоклаве доводили натриевой щелочью до 5,5—5,6. В зависимости от этапа микроклонального размножения в среду добавляли цитокинины, ауксины и гиббереллин. В качестве цитокининов использовали 6-бензиламинопурин (6-БАП) — 0,2—0,5 мг/л, гиббереллинов — промышленный препарат гибберсиб — 2 мг/л, ауксинов — 3-индоллилмасляную кислоту (ИМК), индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), альфа-нафтилуксусную кислоту (НУК) — 0,5—2 мг/л, 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) — 0,1 мг/л.

Эксплантаты и микропобеги культивировали на питательных средах в комнатных условиях при температуре 22—26°C, 16-часовом режиме освещения и интенсивности света 2—5 тыс. лк. В каждом варианте опыта было по 20—40 эксплантатов. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по В. Ю. Урбаху [40], фиксацию, окрашивание, мацерацию и гистологическое изучение растительного материала — в соответствии с методическими указаниями М. Н. Прозиной [32] и работами, выполненными нами ранее [42—44]. Пассажиrowание (пересадку) эксплантатов, конгломератов или микропобегов на свежеприготовленные культуральные среды выполняли в условиях, исключающих их заражение сапрофитной микрофлорой.

Таблица 3

Пролиферация пазушных почек
(число Пробудившихся почек
на 1 конгломерат) у подвоев
и сортов вишни (НСР₀₁ 2,0)
при разных концентрациях 6-БАП

Таблица 2

Приживаемость explantатов сортов
и подвоев вишни (в %) в зависимости
от срока их посадки
на питательную среду (НСР₀₅ 7,3)

Подвой, сорт	Месяц					Среднее за 5 мес
	III	IV	V	VI	VII	
П-3	72	86	64	58	30	62
Облачинская	43	40	36	30	28	35
Владимир- ская	61	62	59	54	30	53
Шубинка	32	28	30	24	15	26
Гриот мос- ковский	68	62	58	50	29	53
Черноокая	44	42	38	32	26	36
Среднее по подвоям и сортам	53	53	48	41	26	44

Подвой, сорт	Концентрация 6-БАП, мг/л					
	0	0,1	0,5	1,0	2,0	5,0
П-3	1	3,2	12,7	24,8	21,9	11,6
П-7	1	2,8	14,2	26,8	19,6	10,1
ВП-1	1	2,4	9,1	19,7	15,6	9,8
Владимир- ская	1	2,6	20,3	27,8	19,1	3,0
Любская	1	3,9	13,8	12,3	8,4	4,9
Шубинка	1	3,2	11,9	14,7	10,4	5,8
Гриот мос- ковский	1	—	12,0	—	—	—
Черноокая	1	—	9,0	—	—	—
Облачинская	1	—	9,0	—	—	—
Среднее по подвоям и сортам	1	3,3	12,4	20,1	14,8	8,2

микропобегов. Каждый период требует введения в питательную среду специфических регуляторов роста, которые и вызывают наблюдаемый морфогенетический эффект. Продолжительность периода размножения можно значительно увеличить путем пересадки (пассажиования) отдельных explantатов, или целиком конгломератов, или его частей на свежую питательную среду.

По нашим данным, поведение explantатов в культуральной среде характеризует преимущественно регенерационную способность верхушечных меристем и одновременно технику вычленения меристем. Так, большинство изолированных explantатов (70—75 %) изученных сортов и подвоев вишни развивается в микропобеги. Снижение их приживаемости вызывается повреждением апикальных структур в процессе вычленения, а также заражением explantатов сапрофитной микрофлорой (25—39 %). Интенсивность пролиферации верхушечной меристемы, ведущей к формированию микропобега, во многом зависит от фазы развития материнских побегов. В наших опытах лучше приживались и затем развивались explantаты, выделенные в период начала и затем интенсивного роста побегов (весной). Однако и в этом случае их приживаемость связана, по нашему мнению, с наследственно обусловленной способностью к репродуктивной регенерации [41] или, по мнению других авторов, к проявлению морфогенетического потенциала [22].

Как видно из табл. 2, уже в первые 3—4 недели культивирования explantатов активный верхушечный рост наблюдался у 50—60 % изо-

Таблица 4

Пролиферация пазушных меристем у микропобегов вишни
(число пробудившихся почек на 1 побег) в зависимости от числа пассажей
(НСР₀₁ 1,8)

Подвой, сорт	Пассаж						
	1	2	3	4	5	6	7
П-3	1	10,7	10,1	13,7	22,1	14,4	13,1
ВП-1	1	10,2	11,7	14,0	23,8	20,3	10,5
Владимирская	1	11,8	11,8	14,1	19,5	11,5	12,3
Любская	1	5,4	6,5	10,8	14,4	6,8	8,7
Молодежная	1	9,6	8,6	14,6	13,4	16,8	11,5
Шубинка	1	5,4	7,3	8,6	20,2	6,5	9,5
Среднее по подвоям и сортам	1	8,9	9,3	12,6	18,9	12,7	10,9

Укореняемость микрочеренков вишни
(% к числу высаженных на укоренение)
при различных способах обработки 3-ИМК

Подвой, сорт	Способ обработки 3-ИМК	
	Водный раствор 25 мг/л, 24 ч	Введение в питательную среду 1 мг/л
П-7	97,3	77,8
ВП-1	83,3	74,3
Владимирская	96,0	84,6
Любская	78,0	76,9
Молодежная	74,7	80,0
Шубинка	95,0	83,3
Гриот московский	87,0	80,0
Среднее по подвоям и сортам	87,4	79,5

Т а б л и ц а 5

Формирование боковых микропобегов
(число побегов длиной 3—4 см,
% к общему числу на 1 эксплантат)
при разных концентрациях гибберсиба

Подвой, сорт	Концентрация гибберсиба, мг/л				
	0	1	2	5	10
П-3	20	35	70	20	0
Облачинская	12	20	40	5	0
Владимирская	18	26	35	4	0
Шубинка	10	18	28	2	0
Гриот московский	30	55	65	10	0
Черноокая	8	42	58	8	0
Среднее по подвоям и сортам	16	33	49	13	0

лированных меристем независимо от сорта или подвоя вишни. Примерно у четверти эксплантатов в этот период отмечались пробуждение и затем рост 2—3 боковых почек в пазухах примордиальных листьев.

Результаты опытов позволяют считать, что вычленение верхушечных меристем и затем их посадку на питательные среды следует проводить ранней весной (в марте — апреле, в период начала пробуждения почек и роста побегов). С целью продления оптимального периода отбора микрочеренков однолетние приросты ростового типа можно хранить в холодильнике при температуре ниже 0 (до -5°C). За 7—10 дней до вычленения эксплантатов прошлогодний прирост помещается в воду на проращивание при комнатной температуре и высокой относительной влажности воздуха.

Второй период микроклонального размножения — самый продолжительный. В наших опытах 2-й пассаж «привыкших» эксплантатов вишни проводился через 20—30 дней после их введения в культуру на питательную среду без ауксинов того же состава или с повышенным содержанием цитокинина (6-БАП). Замечено, что количество пробуждающихся пазушных почек и формирующихся боковых микропобегов зависит от концентрации 6-БАП в культуральной среде. Максимальное число почек и побегов в расчете на один эксплантат развивалось в зависимости от сорта и подвоя при концентрации 6-БАП 0,5—2 мг/л, хотя при концентрации 2 мг/л в ряде случаев отмечалось некоторое уменьшение числа пробудившихся пазушных почек, но различия были малодостоверными (табл. 3).

Как уже отмечалось выше, клональное микроразмножение связано с периодическим перенесением (пассажи́рованием) формирующихся почек и микропобегов на свежеприготовленные питательные среды. При этом у вишни число проведенных пересадок оказывает определенное влияние на пробудимость пазушных почек [25]. В 1-м пассаже, несмотря на присутствие в среде 6-БАП, пробудимости боковых почек не наблюдалось у всех изученных сортов и подвоев вишни, а коэффициент размножения для них был равен 1. Начиная со 2-го пассажа уже отмечалось боковое ветвление микропобега, у которого одновременно продолжался верхушечный рост и формировался конгломерат боковых почек и побегов. Характерной особенностью 3—5-го пассажей является возрастание коэффициента размножения, особенно в 5-м пассаже. В последующих пассажах отмечается снижение пролиферации пазушных меристем до значений, близких к начальному уровню (2-й пассаж).

Таким образом, изучение особенностей развития микропобегов подвоев и сортов вишни в процессе многократного пассажирования выявило их однотипную реакцию — микроразмножение протекает преимущест-

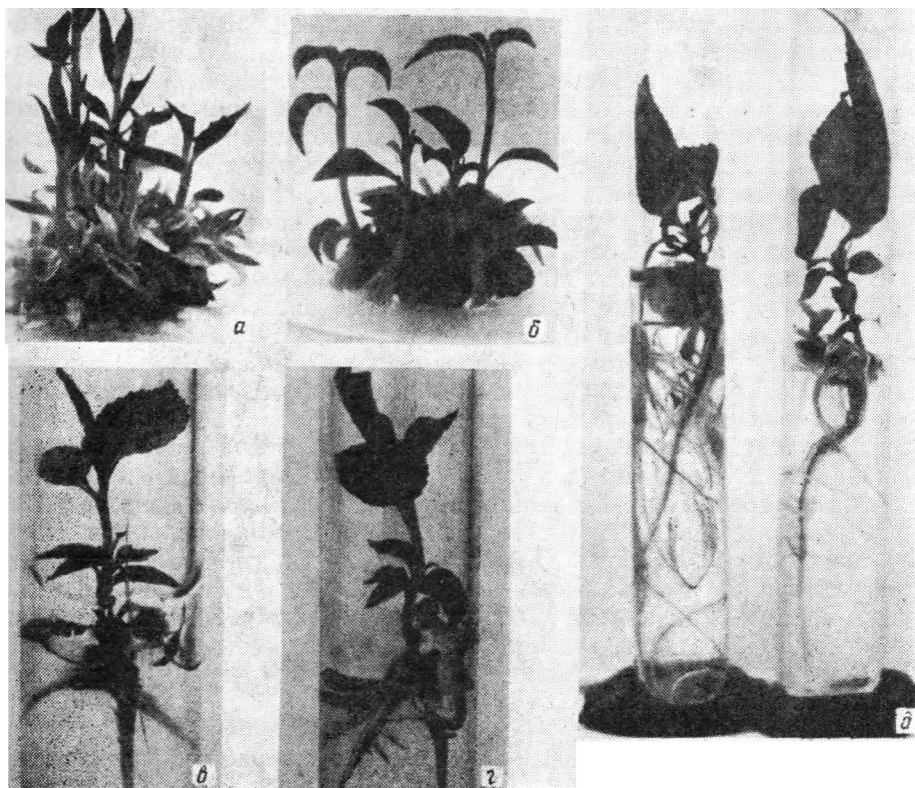


Рис. 1. Развитие меристематической верхушки побега сортов вишни Владимирская (а) и Шубинка (б) в конгломерат пазушных почек и боковых микропобегов на питательной среде размножения Мурасиге — Скуга с 6-БЛП, формирование придаточных корней у микрочеренков вишни сортов Облачная (в) и Владимирская (г) на 25-й день после посадки на среду укоренения (с 3-ИМК, 1 мг/л) в стерильных условиях, развитие разветвленной корневой системы первичного анатомического строения у укорененных микрочеренков вишни Владимирская (?) на 50-й день после посадки на среду укоренения, перед их пересадкой на доращивание.

венно в результате заложения пазушных почек, их пробуждения и затем на их основе формирования боковых побегов (табл. 4). Соответственно порядок ветвления микропобегов увеличивался от пассажа к пассажи, несмотря на идентичность примененных регуляторов роста и их одинаковые концентрации. Отсюда мы полагаем, что при определении эффективности действия синтетических или нативных регуляторов необходимо использовать однотипные эксплантаты, прошедшие одинаковое число пересадок.

Для стимуляции развития и удлинения боковых микропобегов в 3-м пассаже в питательную среду вводили производное гибберелловой кислоты — промышленный препарат гибберсиб. Пригодными для последующего пассажирования считали побеги длиной 3—4 см (табл. 5). Гибберсиб способствовал пробуждению пазушных почек на основном микропобеге и вызывал на его стебле формирование боковых побегов, пригодных для пересадки на среду укоренения. Лучшая концентрация — 2 мг/л.

Важной операцией в системе микроклонального размножения является укоренение микропобегов на агаровой питательной среде, в которую в отличие от среды размножения не вводился 6-БАП и добавлялись синтетические ауксины, стимулирующие придаточное корнеобразование. Процесс этот до настоящего времени мало изучен. Для укоренения микропобегов нами использовалась среда Мурасиге и Скуга, а в качестве ауксиновых регуляторов роста испытывались 3-ИМК, ИУК и НУК, которые вводились в среду укоренения. Наибольшее число укоренившихся

микрочеренков было получено на среде с НУК. Однако при этом на базальном участке стебля наблюдалось интенсивное разрастание каллуса, что затрудняло перенос пробирочных растений с корнями в нестерильные условия. На питательной среде с 3-ИМК в концентрации 2 мг/л и выше на стеблевой части микрочеренков формировались короткие, сильно утолщенные придаточные корни и не образовалось боковых корней 2-го порядка ветвления. Сходная, хотя и менее выраженная, реакция наблюдалась при введении в среду 3-ИМК в концентрации 1 мг/л. Поэтому мы полагаем возможным при укоренении микрочеренков в асептических условиях использовать 3-ИМК в концентрации 1 мг/л.

В опытах, где в питательные среды одновременно вводили 3-ИМК и адсорбированный уголь в дозах 1—2 г/л, было выявлено, что этот адсорбент инактивирует ризогенное действие регулятора. На таких средах микрочеренки укореняются, но формируют разветвленную корневую систему с боковыми всасывающими корнями 2-го порядка (рис. 1), как в вариантах с посадкой черенков на укоренение без предварительной обработки ауксиновыми регуляторами и без их введения в среды. Эти наблюдения свидетельствовали о необходимости определения оптимальных способов обработки микрочеренков 3-ИМК в специальных опытах. Проведенные эксперименты показали, что обработки микрочеренков длиной 2—4 см водным раствором 3-ИМК более эффективны, чем введение этого регулятора в культуральную среду (табл. 6). Массовое появление первых придаточных корней у основания стебля в первом случае отмечалось на 20—25-й день, а в последнем — на 26—30-й день, причем у отдельных сортов вишни (Молодежная, Любская) период укоренения микрочеренков растягивался до 40—50 дней.

Таким образом, предварительная обработка микрочеренков вишни водным раствором 3-ИМК и их последующая посадка на питательную среду без 6-БАП и ауксинов сокращают продолжительность формирования придаточных корней и одновременно позволяют повысить выход пробирочных растений с разветвленной корневой системой. Следует, однако, подчеркнуть, что указанный способ весьма трудоемкий и при массовом размножении малоприемлем. В связи с этим необходим дальнейший поиск оптимальных концентраций спиртовых концентрированных растворов ауксиновых регуляторов.

Изучение процессов корнеобразования на искусственных питательных средах показало, что микрочеренки всех отобранных для опыта клоновых подвоев и сортов вишни относительно легко укореняются (до 70—90 %). Однако у трудноукореняемых сортов вишни (Любская, Молодежная, Апухтинская и др.), несмотря на довольно высокую укореняемость в стерильных условиях, они формируют слабо развитую, без боковых разветвлений корневую систему. Укорененные микрочеренки этих сортов при их пе-

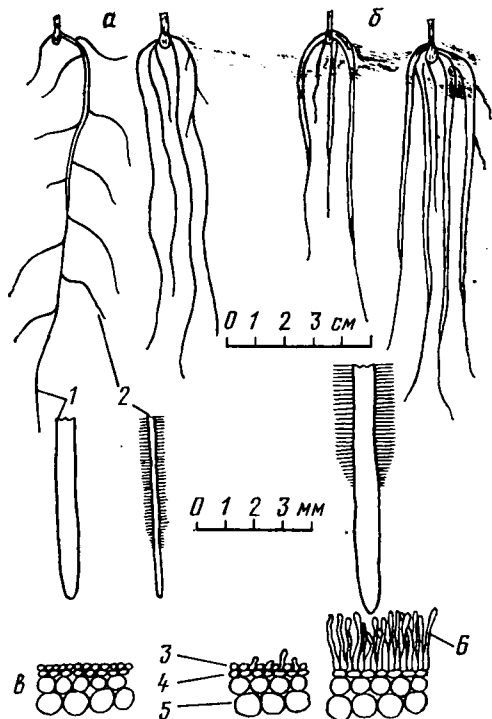


Рис. 2. Формирование придаточных корней микропобегами вишни сорта Владимирская на питательной среде укоренения без 6-БАП при отсутствии ауксиновых регуляторов роста (а) и с 3-ИМК (б); схема дифференциации эпилемы корня, X70 (в).

1 — ростовой корень; 2 — всасывающий корень; 3 — эпилема; 4 — экзодерма; 5 — паренхима первичной коры; 6 — корневые волоски эпилемы

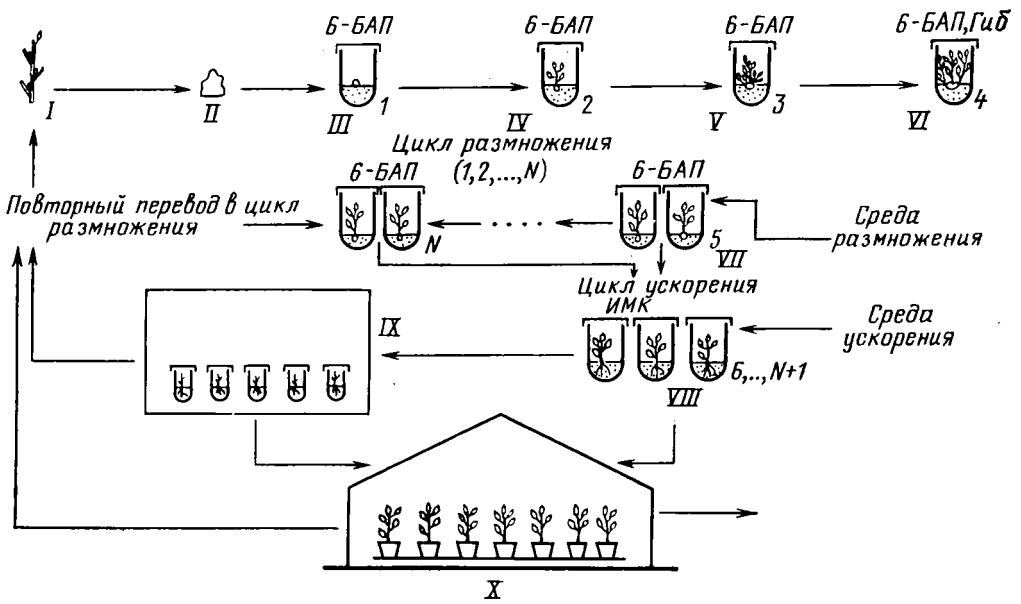


Рис. 3. Схема микроклонального размножения сортов и клоновых подвоев вишни из верхушечных меристем в стерильных условиях на искусственной питательной среде Мурасиге — Скуга:

I — стерилизация части побега длиной до 1 см; *II* — выделение эксплантата длиной 200—500 мкм; *III* — введение эксплантата в питательную среду и его рост; *IV* — формирование микропобега; *V* — формирование конгломерата почек и побегов; *VI* — формирование конгломерата микропобегов длиной 2—4 см; *VII* — деление конгломерата на микропобеги и их посадка на питательные среды; *VIII* — корнеобразование и рост побегов; *IX* — хранение микропобегов в холодильнике при +3...+5 °С; *X* — перевод в нестерильный субстрат на доращивание; 1, 2, ..., *N* — номера очередных пассажей цикла размножения; 6, ..., *N*+1 — номера очередных пассажей цикла укоренения. В схеме вместо ускорения следует читать укоренения.

ренесении на доращивание плохо приживаются и нередко погибают (до 50—70 %).

В качестве микрочеренков при клональном микроразмножении обычно берутся боковые побеги в 3—5-м пассажах или микропобеги, сформированные в виде конгломерата эксплантатов верхушечной меристемы. В последнем случае микрочеренки, как свидетельствуют наши опыты, лучше отделять от конгломерата с кусочком каллюса без обновления среза. Микрочеренки с частью каллюсного наплыва при посадке на среду с ауксинами уже на 6—10-й день формировали придаточные корни, а через 20—30 дней после их посадки на среду укоренения развивали в пробирочной культуре побеги длиной 5—6 см с 5—7 листьями и корневую систему с боковыми корнями 2-го порядка ветвления. Укореняемость таких микрочеренков в среднем по всем изученным подвоям и сортам составила 70—80 %, а у черенков без кусочка каллюса она была хуже (рис. 2).

При микроклональном размножении плодовых растений наиболее узким местом, по мнению многих исследователей и нашим данным, пока остается процесс переноса пробирочных укорененных растений в нестерильные условия. Именно на данном этапе погибает значительная часть (80—95 %) посадочного материала. Изучение специфики этого процесса показало, что мини-растения, пересаженные в субстрат (почву или субстрат, состоящий из смеси торфа, песка и перлита в объемном соотношении 1:1:1) в ноябре — декабре, находятся, как правило, в покое и не возобновляют своего роста. Если же пробирочные растения доращивают весной (в конце февраля — в марте) в условиях защищенного грунта, то отмечается рост их надземной части и удовлетворительная адаптация к новым экологическим условиям; приживаемость в зависимости от формы колеблется в пределах 50—90 %. Укорененные пробирочные растения, полученные в осенне-зимний период, целесообразно, согласно нашим данным [14, 31], хранить в течение 2 мес и более до

момента пересадки при низкой положительной температуре (3—5°C) на свету. Такая «холодовая предобработка» обеспечивает более высокую их приживаемость при доразращивании.

Согласно результатам исследований, проведение микроклонального размножения вишни из верхушечных меристем можно свести к следующим основным операциям, обеспечивающим прохождение определенной фазы развития растений (рис. 3).

1. Введение эксплантата на стерильную питательную среду Мура-сиге и Скуга с 6-БАП (0,2 мг/л) и 2,4-Д (0,1 мг/л) и его культивирование до формирования микропобега.

2. Пересадка микропобега, развившегося из верхушечной меристемы, на свежеприготовленную среду без 2,4-Д, но с увеличением концентрации 6-БАП по 0,5 мг/л. В это время идет формирование конгломерата пазушных почек и боковых микропобегов.

3. Пересадка конгломератов в бюксы диаметром 6—7 см на питательную среду с 6-БАП (0,2 мг/л) и гибберсибом (2 мг/л). Этап удлинения микропобегов конгломерата.

4. Деление конгломерата на микрочеренки (с кусочком каллюса) длиной 2—4 см и их последующая посадка:

— на среду размножения (многократное пассажирование на среде с 0,5 мг 6-БАП на 1 л без ауксинов для повышения коэффициента размножения исходного эксплантата);

— на среду укоренения без гибберсиба и 6-БАП; черенки предварительно обрабатываются водным раствором 3-ИМК или этот регулятор вводится в состав питательной среды.

5. Проведение «Холодовой предобработки» укорененных пробирочных растений (1—2 мес и более) при положительной температуре 3—5°C на свету.

6. Пересадка пробирочных растений в нестерильную среду на доразращивание для получения стандартного посадочного материала.

Продолжительность каждого этапа микроразмножения колеблется в зависимости от состава питательной среды и цели пассажа от 20—30 до 50 дней, поэтому в целом весь цикл от выделения эксплантата до получения пробирочных растений, пригодных для пересадки в нестерильные условия, составляет 7—8 мес, а при проведении 2—4 пассажей микропобегов на среде размножения — 10—12 мес.

Гистологические особенности развития эксплантатов и микропобегов на питательной среде размножения

Используемый при микроклональном размножении эксплантат, называемый верхушечной меристемой, имеет первичное анатомическое строение, характерное для интактной структуры. При помещении таких эксплантатов на стерильную питательную среду апикальная меристема начинает функционировать, при этом в результате верхушечного роста идет увеличение числа листьев, узлов, междоузлий и в целом линейных размеров эксплантата. Так формируется миниатюрный побег с листьями различной степени развития — от примордиальных до почти полностью развитых. В пазухах листьев закладываются пазушные почки, более развитые в нижней части стебля. У стебля микропобега длиной до 5—9 мм первичное анатомическое строение. Покровная ткань представлена одним слоем эпидермальных клеток с выраженной кутикулой. Эпидермальные клетки бесцветные, радиально вытянутые, в основном столбчатой формы, что нехарактерно для вторичного строения стебля вишни. Эта первичная покровная ткань стебля имеет одно- и двухклеточные простые волоски, а также устьица. Под эпидермисом располагается колленхима в виде сплошного 2—3-слойного кольца. Ее клетки по форме изодиаметрические, тангентально несколько вытянутые, с более толстыми стенками, чем у паренхимных клеток первичной коры. Коровая паренхима гомогенная, состоит из 7—10 слоев клеток с крупными межклетниками. Расположение клеток в этой зоне неупорядоченное,

однако самый внутренний одно- или двухрядный паренхимный слой состоит из однородных, тангентально вытянутых клеток, плотно прилегающих друг к другу. Этот слой клеток разные авторы называют эндодермой, крахмалоносным влагалищем или внутренним слоем первичной коры стебля [45, 46].

При первичном анатомическом строении на периферии центрального цилиндра видна дифференцирующаяся периваскулярная первичная склеренхима перициклического происхождения. Склеренхимная обкладка приурочена к проводящим пучкам и вплотную примыкает к первичной флоэме. Число таких открытых коллатеральных проводящих пучков зависит от зоны стебля микропобега. В верхней его части их число составляет 10—12 и более. Первичная флоэма отграничена от первичной ксилемы слоем прокамбия.

Сердцевина стебля при его первичном строении гомогенная, она представлена изодиаметрическими паренхимными клетками медулы, которые, входя в зону ксилемы и флоэмы, несколько радиально вытягиваются. В последующем на их основе формируются первичные однорядные или чаще многорядные (2—4) сердцевинные лучи. Перимедулярная зона в этот период выражена слабо. Первичная ксилема представлена трахеальными элементами (сосудами и трахеидами), слабо дифференцированными волокнами либриформы и апотрахеальной диффузной паренхимой. Членики сосудов короткие (30—60 мкм при диаметре 5—8 мкм) с простыми перфорациями. Вторичные клеточные стенки трахеальных элементов имеют спиральные и кольчатые утолщения, характерные для растущих осевых частей двудольных растений.

В месте прикрепления листа к стеблю проводящие пучки из черенка входят в первичную кору стебля и затем в центральный цилиндр, образуя 2 латеральных и 1 медианный листовые следы. В месте вхождения листовых следов в проводящий цилиндр стебля на поперечных срезах детально прослеживается более широкая межпучковая зона — листовая щель, или лакуна. Помимо листовых следов, ниже зоны узла проходит проводящий пучок, связывающий стебель с пазушной почкой. Почка связана со стеблем одним почечным (веточным) следом, имеющим одну широкую лакуну, заполненную паренхимными клетками.

На 9—12-й день культивирования эксплантатов на уровне 5—9 мм от его верхней части в направлении от апекса к нижней части микропобега наблюдается переход от первичного анатомического строения стебля ко вторичному. В проводящих пучках из прокамбия возникает камбий, который начинает развиваться в направлении межпучковой паренхимы и, сомкнувшись, начинает функционировать с образованием непрерывного кольца ксилемы и флоэмы. Камбий формирует снаружи вторичную флоэму, а вовнутрь — вторичную ксилему, имеющие свои осевые и радиальные системы. В результате функционирования камбия стебель побега радиально утолщается. Клетки эпидермиса в процессе вторичного роста стебля испытывают натяжение, в результате чего из столбчатых становятся тангентально удлинёнными. Пластинчатая колленхима почти не изменяется, ее тангентально вытянутые клетки одинакового размера (в 1,5—2 раза меньше, чем клетки коровой паренхимы).

Одновременно с работой камбия на 9—12-й день культивирования наблюдается окончательная дифференциация периваскулярных перициклических волокон склеренхимы, локализованных между крахмалоносным влагалищем и первичной флоэмой. Склеренхимная обкладка 2—4-слойная, клеточные стенки интенсивно окрашиваются в малиново-красный цвет при обработке срезов флороглюцином с соляной кислотой. Пучки склеренхимы локализованы на периферии центрального Цилиндра стебля. В целом склеренхимное кольцо прерывистое, его замкнутость составляет 50—60 %. Структура крахмалоносного влагалища при вторичном строении стебля сходна с первичной.

При активном вторичном утолщении стебля на 10—15-й день культивирования эксплантатов наблюдается заложение вторичной покровной ткани. Феллоген закладывается непосредственно под эпидермисом,

в первом наружном слое колленхимы. Кнаружи от этой вторичной меристемы формируются 2—3 слоя пробки (феллемы), а конутри — 1 слой паренхимных клеток феллодермы. По мере увеличения диаметра стебля феллоген не прерывается благодаря делению его клеток в радиальном направлении. При вторичном анатомическом строении стебля структура ксилемы более плотная, чем при первичном, но по элементам, ее составляющим, различий не отмечается. Вторичная ксилема рассеяно-сосудистая с апотрахеальной диффузной осевой паренхимой. Первичные сердцевидные лучи в основном однорядные, хотя имеются и многорядные, гомогенные; состоят из лежащих клеток лучевой паренхимы.

На поверхности среза микропобега в ответ на поранение развивается каллус, состоящий из паренхимных, почти изодиаметрических клеток, расположенных без определенного порядка; межклетники развиты слабо, клеточные стенки тонкие. С внешней стороны он покрыт слоем более мелких однородных клеток, напоминающих клетки эпидермиса, но не имеющих волосков и устьиц. Формируется каллус в глубине тканей стебля, особенно в его прикамбиальной зоне. В образовании каллуса принимают участие живые клетки паренхимы коры, камбия, сердцевинных лучей, перимедулярной зоны и частично сердцевины. В результате их деления происходит разрастание базальной зоны стебля в толщину, при этом клетки покровных тканей не претерпевают столь частых делений. Вследствие интенсивного формирования каллуса покровная ткань и боковые почки у основания побега оказываются расположенными на его поверхности. Детальное изучение особенностей формирования каллуса выявило неоднородность этой ткани. Помимо паренхимных клеток, в нем наблюдается заложение раневого камбия, функционирование которого внутри каллуса ведет к развитию так называемых «гидроцитных тяжей», причудливо скрученных, извилистых, не связанных между собой участков ксилемы и флоэмы. Конутри такого тяжа расположена ксилема, кнаружи — флоэма. Эта проводящая гидроцитная ткань не связана с проводящей системой центрального цилиндра стебля, а ее формирование вызвано, вероятно, наличием синтетических фитогормонов в питательной среде или же продуцированием нативных регуляторов развивающимися молодыми структурами эксплантата. Трахеальные элементы ксилемы гидроцитных тяжей представлены в основном трахеидами и трахеиподобными волокнами либриформа и не имеют осевой и лучевой паренхимы, а также сосудов.

Каллюсная ткань в основании микропобега развивается уже на 3—8-й день после высадки эксплантата на размножение без видимой остановки митотического деления инициальных клеток меристемы. Аналогичные результаты ранее получили сотрудники лаборатории культуры тканей и морфогенеза Института физиологии растений АН СССР при инкубировании изолированной (без листовых примордиев) меристемы томата [7]. Ими было установлено, что в первые 2 сут после помещения меристемы на питательную среду интенсивность делений оставалась той же, что у материнского интактного растения, в последующие 3—7 сут она снижалась, а через 7 сут возвращалась к исходному уровню (0—2 сут). Одновременно инициальные клетки апекса не делились, хотя в них происходил синтез ДНК и они дифференцировались («редифференцировались как прозенхимные клетки» [7, с. 13]), вероятно, в паренхимную ткань сердцевины стебля. Иными словами, согласно экспериментальным данным [7], изолированная меристема на питательной среде размножения с регуляторами роста довольно легко формирует в базальной части каллус, а расположенные выше меристематические клетки дифференцируются в соответствующие структурные элементы микропобега. Поэтому утверждение [7, рис. 7 и с. 12—13], что «...дифференцировка делящейся меристематической клетки связана с остановкой делений, деспециализацией клетки и только после этого — с индукцией делений, приводящих к образованию массы каллюсных клеток», не соответствует опытным данным и приведенным микрофотографиям делящихся клеток [7, рис. 7, 1—3, с. 12], а также результатам наших на-

блюдений за особенностями формирования каллуса в основании верхушечных микропобегов при их культивировании.

В каллусной ткани заложения и затем формирования придаточных корней не обнаружено. В ней отмечен процесс гистогенеза, выражающийся в дифференциации вновь образующихся элементов, дериватов раневого камбия — гидроцитных пучков и тяжей. Вероятно, образование этих проводящих элементов зависит от наличия в питательной среде не только 6-БАП, но и нативных цитокининов и ауксинов.

Каллус, развивающийся в базальной части стебля микрочеренков вишни, не обладает органогенной способностью, и на его основе не формируются какие-либо придаточные структуры, т. е. исключается вероятность получения генетически разнокачественного материала. Микроклональное размножение вишни верхушечными меристемами происходит в результате бокового ветвления микропобега, что обеспечивает развитие растений, генетически идентичных родительским формам. Действительно, в течение 1-го пассажа эксплантаты вторично утолщаются, у них отмечается только верхушечный рост в длину без бокового ветвления. Однако во 2-м пассаже микропобегов наряду с ростом в длину наблюдаются активное пробуждение боковых пазушных почек и последующее формирование боковых побегов. Таким образом, во 2-м пассаже происходит снятие апикального доминирования [11, 12] верхушечной меристемы. Доказательством бокового ветвления материнской оси является наличие непрерывной связи проводящих систем боковых почек и побегов с центральным цилиндром стебля микропобега.

Для апикальной меристемы, локализованной в верхней зоне побега, характерна высокая активность, приводящая к интенсивному ветвлению, формированию разветвленного конгломерата почек и боковых микропобегов. Эта меристема продуцирует боковые примордии, дающие начало зачаточным листьям и в их пазухах — боковым почкам. Результатом функционирования меристемы является образованием почек, имеющих все структурные элементы взрослого побега. Почка развивается в побег, но могут и ветвиться, образуя боковую систему разветвленного побега, которая внешне слабо выражена вследствие очень коротких междоузлий стебля. При таком ветвлении почек наблюдается сильное разрастание тканей у основания материнской почки, в зоне листовой подушки. Ветвление происходит, вероятно, под влиянием входящего в состав питательной среды 6-БАП, снимающего апикальное доминирование. Под действием этого цитокинина начинают развиваться ранее заложенные пазушные почки и закладываются новые. В каждой из имеющихся почек в результате снятия тормозящего действия апекса начинают функционировать апикальные меристемы боковых почек и соответственно формируются новые. У этих вновь образовавшихся почек также наблюдаются снятие под влиянием 6-БАП апикального доминирования и пробуждение меристем. Морфологически указанный процесс выглядит как образование боковых почек более высоких порядков ветвления. Наличие непрерывной связи проводящих систем формирующихся пазушных почек с первичными тканями центрального цилиндра стебля свидетельствует о боковом ветвлении материнского побега, так как проводящая система придаточных почек связана только с вторичными тканями.

Таким образом, в основе процесса микроклонального размножения вишни методом культуры изолированных верхушечных меристем лежит явление снятия апикального доминирования, что способствует последующему развитию уже существующих меристем и обеспечивает генетическую однородность посадочного материала.

Гистологические особенности развития микропобегов и придаточных корней на питательной среде укоренения

При пассажировании микрочеренков вишни с питательной среды размножения на среду укоренения зона корнеобразования стебля имеет вторичное анатомическое строение в результате функционирования кам-

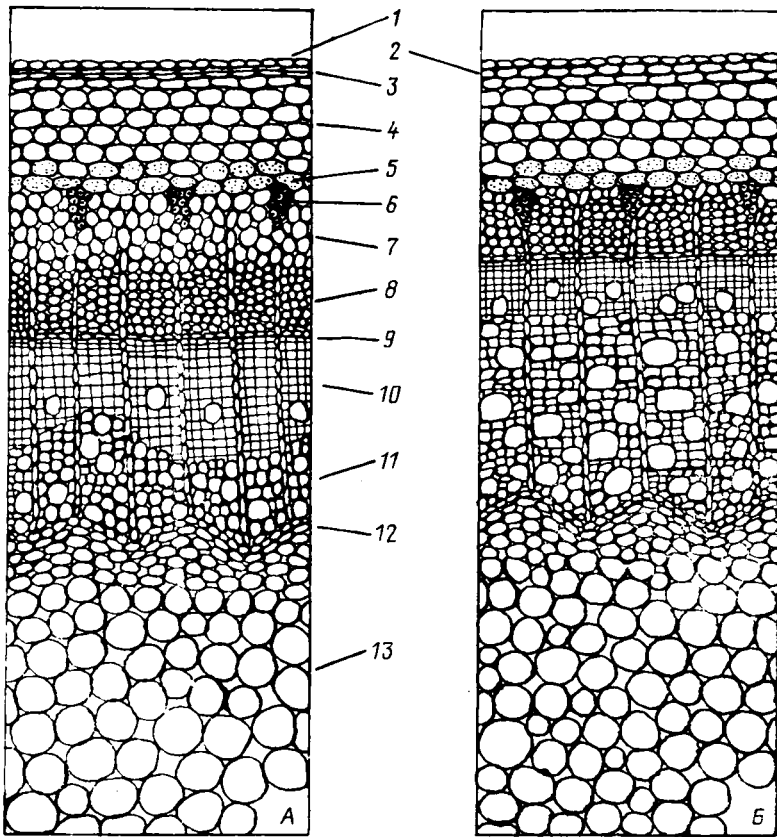


Рис. 4. Поперечный разрез нижней части стебля микропобега вишни на питательной среде укоренения с 3-ИМК (А) и без регулятора роста (Б, схематизированно, $\times 70$).

1 — эпидермис; 2 — колленхима; 3 — начало заложения феллогена в субэпидермальной зоне колленхимы; 4 — паренхима первичной коры; 5 — крахмалосное влагалище; 6 — склеренхима периклического происхождения; 7 — крупные паренхимные клетки флоэмы и дилатирующих сердцевинных лучей во флоэмной зоне стебля; 8 — вторичная флоэма; 9 — камбий; 10 — молодая регенерированная ксилема; 11 — вызревшая ксилема с лигнифицированными клеточными стенками; 12 — перимедулярная зона; 13 — гомогенная паренхима сердцевины.

бия. Уже на 5—7-й день культивирования микропобегов в нижней их части наблюдается интенсивное разрастание тканей. Рост тканей между вторичной ксилемой и склеренхимным кольцом происходит вследствие формирования камбием регенерированной ксилемы и разрастания паренхимы во флоэмной части, примыкающей к склеренхиме (рис. 4). Гистологически молодая ксилема отличается от вторичной; для нее характерно слабое развитие сосудов и преимущественное формирование трахеид и трахеидоподобных элементов. В этом отношении структурные изменения, наблюдаемые при укоренении микрочеренков в стерильной культуре, однотипны и принципиально не отличаются от процессов, протекающих при укоренении зеленых черенков [3, 10], о чем свидетельствуют данные табл. 7. С формированием в зоне корнеобразования молодых проводящих тканей в прикамбиальной части стебля микрочеренка наблюдается заложение апикальных меристем придаточных корней. Они закладываются лучевыми инициалами камбия на поверхности молодой ксилемы, причем веретеновидные инициалы, прямо не связанные с дифференциацией корневых меристем, тангентально делятся, поэтому меристематические примордии корней оказываются несколько заглубленными в регенерированную ткань стебля. Инициальный слой одновременно образуется и в начавшем расти корне, он соединяется с камбием стебля в непрерывную меристему. Следует подчеркнуть, что проводящие ткани придаточного корня одного возраста с проводящими тканями

Развитие ксилемных элементов (в числителе — длина, в знаменателе — ширина или диаметр клетки, мкм) в зоне корнеобразования стебля черенков вишни в зависимости от наличия в среде 3-ИМК и технологии укоренения

Тип древесины*	Вариант опыта	Членики сосудов	Трахеиды	Волокна	Паренхима	
					осевая	лучевая
Зеленое черенкование						
Сорт Владимирская						
ВК	—	$\frac{473 \pm 15}{37 \pm 3}$	$\frac{540 \pm 6}{11 \pm 1,5}$	$\frac{663 \pm 20}{11 \pm 0,4}$	$\frac{91 \pm 9}{8 \pm 0,7}$	$\frac{35 \pm 4}{11 \pm 2,6}$
РК	ИМК	$\frac{175 \pm 18}{23 \pm 2}$	$\frac{187 \pm 12}{10 \pm 1,1}$	$\frac{265 \pm 13}{12 \pm 0,2}$	$\frac{66 \pm 4}{11 \pm 0,5}$	$\frac{36 \pm 5}{21 \pm 3,2}$
РК	—	$\frac{275 \pm 20}{42 \pm 5}$	$\frac{205 \pm 15}{13 \pm 1,5}$	$\frac{407 \pm 16}{17 \pm 1,2}$	$\frac{60 \pm 6}{11 \pm 0,4}$	$\frac{32 \pm 2}{28 \pm 1,4}$
Подвой П-7						
ВК	—	$\frac{260 \pm 10}{50 \pm 3}$	$\frac{340 \pm 15}{14 \pm 1}$	$\frac{594 \pm 18}{11 \pm 0,4}$	$\frac{86 \pm 7}{17 \pm 2}$	$\frac{32 \pm 3}{31 \pm 4}$
РК	ИМК	$\frac{165 \pm 14}{50 \pm 2,7}$	$\frac{143 \pm 6}{14 \pm 1,2}$	$\frac{627 \pm 17}{11 \pm 1,2}$	$\frac{76 \pm 6}{10 \pm 0,4}$	$\frac{24 \pm 2}{24 \pm 3,5}$
РК	—	$\frac{228 \pm 8}{41 \pm 0,5}$	$\frac{308 \pm 16}{19 \pm 1,5}$	$\frac{520 \pm 22}{11 \pm 0,6}$	$\frac{78 \pm 5}{18 \pm 1,2}$	$\frac{45 \pm 3}{44 \pm 2,5}$
Микроклональное размножение						
Сорт Владимирская						
РК	ИМК	$\frac{176 \pm 14}{15 \pm 2}$	$\frac{340 \pm 8}{11 \pm 0,4}$	$\frac{1200 \pm 32}{11 \pm 0,1}$	$\frac{60 \pm 5}{11 \pm 0,2}$	$\frac{66 \pm 5}{33 \pm 0,4}$
РК	—	$\frac{590 \pm 20}{45 \pm 2}$	$\frac{490 \pm 12}{11 \pm 0,6}$	$\frac{820 \pm 23}{8 \pm 0,3}$	$\frac{42 \pm 4}{11 \pm 0,5}$	$\frac{66 \pm 3}{34 \pm 2}$
Подвой П-7						
РК	ИМК	$\frac{160 \pm 10}{36 \pm 3}$	$\frac{240 \pm 12}{11 \pm 2}$	$\frac{720 \pm 24}{11 \pm 0,8}$	$\frac{40 \pm 3}{15 \pm 1,2}$	$\frac{60 \pm 4}{33 \pm 5}$
РК	—	$\frac{280 \pm 12}{40 \pm 4}$	$\frac{360 \pm 9}{11 \pm 1,2}$	$\frac{800 \pm 19}{10 \pm 1,5}$	$\frac{35 \pm 4}{14 \pm 2}$	$\frac{55 \pm 5}{30 \pm 3}$

* ВК — вторичная ксилема с лигнифицированными клеточными стенками, РК — молодая регенерированная ксилема.

стебля микрочеренка; находясь в состоянии дифференциации, они в последующем растут согласованно, что объясняется наличием непрерывного инициального слоя между прокамбием корня и камбием стебля. Непрерывность этого слоя в зоне перехода от стебля в корень обеспечивает формирование элементов ксилемы, детерминированных как проводящие элементы в системе стебель — корень. Первые зрелые элементы ксилемы корня возникают в зоне его соприкосновения с регенерированной ксилемой стебля. Эти элементы, обеспечивающие переход ксилемы стебля в ксилему корня, представлены трахеидами и члениками сосудов со спиральными, кольчатыми и лестничными утолщениями вторичных клеточных стенок. Конфигурация их весьма разнообразна. В пределах ростового придаточного корня последовательность дифференциации проводящих тканей связана с обособлением в стеле 4—5 тяжей первичных ксилемы и флзумы. В дальнейшем, по мере роста придаточного корня в толщину, его ксилема одревесневает центростремительно и клетки между трахеидными тяжами становятся одревесневшими.

Введение в питательную среду ауксинов привело к морфологическим и гистологическим изменениям ростовых корней (табл. 8) и практически не влияло на размеры центрального цилиндра и его архность

Гистология ростовых корней укорененных микропобегов вишни
в зависимости от наличия в среде укоренения 3-ИМК (в числителе — длина,
в знаменателе — диаметр или ширина элементов)

Показатель	Среда укоренения	
	без 3-ИМК	с 3-ИМК, 1 мг/л
Диаметр корня, мм	0,6—0,7	1,3—2,5
Архность стелы, шт.	4—5	4—5
Число слоев паренхимы первичной коры	7—10	7—10
Диаметр паренхимных клеток коры, мкм	25—30	60—70
Число слоев перидикла	2—3	3—5
Корневые волоски, мкм	—	400—600
	—	10—16
Диаметр центрального цилиндра, мкм	300—400	300—400
	1200—1500	280—400
Волокна либриформа, мкм	6—15	6—10
	100—330	100—220
Членики сосудов, мкм	11—22	10—30
	600—1000	500—640
Трахеиды, мкм	10—20	10—12
	20—25	22—30
Осевая паренхима, мкм	10—11	10—11

(рис. 5). Отличительной чертой развития ростовых корней на безауксиновой питательной среде является формирование на них боковых всасывающих корней 2-го порядка ветвления и полное отсутствие корневых волосков эпиблемы. Интересно также отметить, что на обеих средах киселемные элементы ростовых корней были представлены однотипными структурами, однако они отличались от аналогичных фрагментов всасывающего корня по линейным размерам и морфологии (рис. 6).

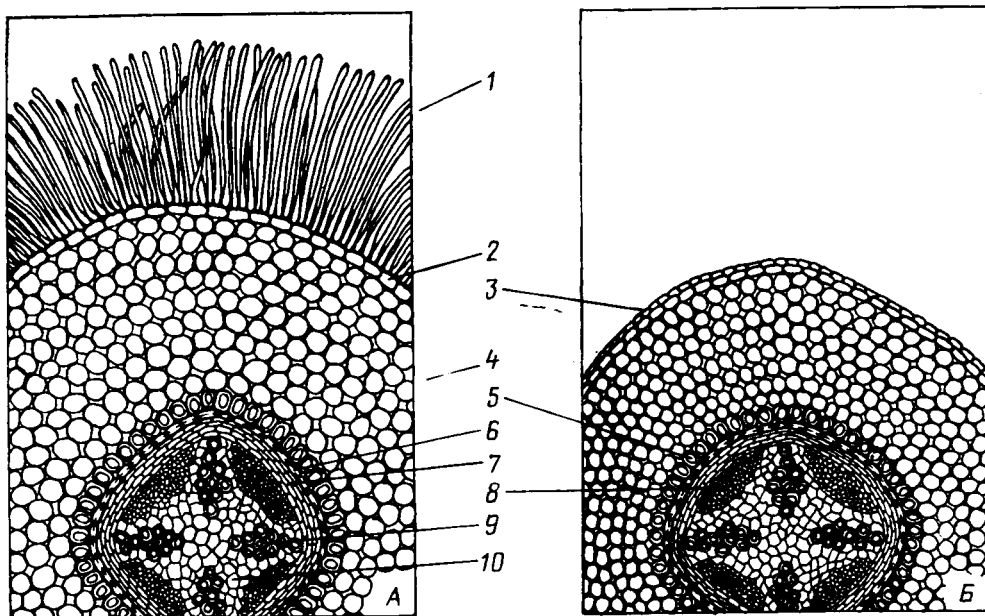


Рис. 5. Анатомическое строение ростовых корней укорененных микропобегов вишни сорта Владимирская на питательной среде укоренения с 3-ИМК (А) и без регулятора роста (Б, схематизировано, X70).

1 — корневые волоски эпиблемы; 2 — экзодерма; 3 — эпиблема без корневых волосков; 4 — первичная кора; 5 — арматурное кольцо; 6 — эндодерма; 7 — многослойный (3—5-слойный) перидикл; 8 — первичная флоэма; 9 — первичная ксилема; 10 — склерифицированная соединительная ткань центрального цилиндра (сердцевинная паренхима корня).

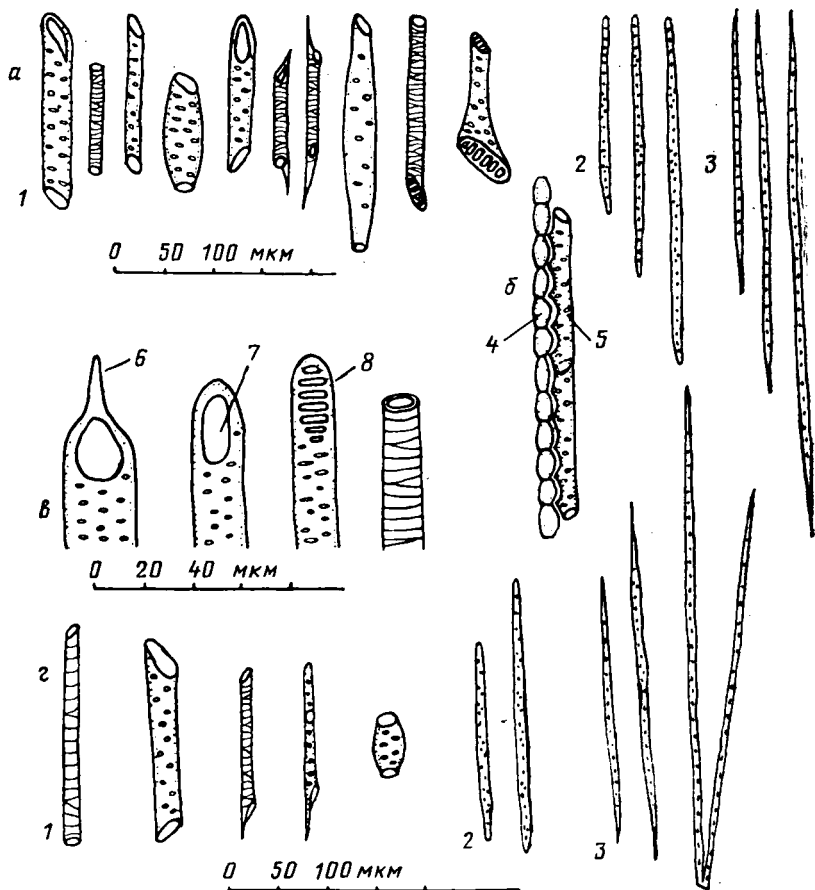


Рис. 6. Структурные элементы первичной ксилемы растущих (а, б, в) и всасывающих (г) придаточных корней сформированной питательной среде укоренения в процессе микроклонального размножения вишни.

а — разнообразие трахеальных элементов проводящей системы растущего корня; б — формирование дизъюнктивных сосудистых фрагментов; в — конечные стенки члеников сосудов с перфорациями разного типа; г — разнообразие трахеальных элементов проводящей системы всасывающего корня; 1 — членики сосудов; 2 — трахеиды; 3 — волокна либриформа; 4 — лучевая паренхима; 5 — дизъюнктивные элементы сосуда с боковыми клеточными стенками, деформированными тяжем лучевой паренхимы; 6 — клювик членика сосуда; 7 и 8 — простая и лестничная перфорации.

Обсуждение результатов исследования

Микроклональное размножение, или микрочеренкование древесных плодовых растений, включая и вишню, на основе изолированных верхушечных меристем обеспечивает сохранение генетических свойств и идентичность дочернего потомства и этим принципиально не отличается от других способов вегетативного возобновления, применяемых в промышленном питомниководстве. В технологическом плане микрочеренкование проводят в лабораторных условиях на искусственных питательных средах, и в этом отношении оно сходно с культурой изолированных тканей, клеток и протопластов. Однако в последнем случае в отличие от культуры верхушечных меристем [13, 39, 48] формирование эмбриоидоподобных растений, внешне напоминающих развивающиеся зародыши на эмбриональной фазе онтогенеза, идет в соответствии с закономерностями соматического эмбриогенеза [13, 28]. Следует также подчеркнуть, что восстановление целостного растительного организма протекает на базе репродуктивной регенерации [41, 43], а это, в свою очередь, обуславливает морфолого-физиологическое сходство восстановительных процессов и соответственно новообразованных структур и органов. Филогенетически такое сходство объясняется гомологией и однонаправленным

Выход укорененных растений вишни в зависимости от числа пассажей в расчете на 1 исходный эксплантат (среднее по 6 сортам и клоповым подвоям)

Пассаж	Коэффициент размножения		Наличие укорененных микропобегов, шт.		Наличие растений в нестерильной среде, шт.
	расчетный	фактический	расчетное	фактическое	
1	1	0,7	0	0	0
2	1	0,6	0	0	0
3	1	0,5	0	0	0
4	8,9	5—6	8,9	2	1
5	9,3	5—6	82,8	8	4
6	12,6	8—10	1 043	50	25
7	18,9	10—15	19 718	420	210
8	12,7	8—10	350 190	2 646	1300
9	10,9	6—8	3 817 071	13 230	6500
		Выход после 9-го пассажа, %			
	—	—	100	0,34	0,16

становлением у высших растений основных вегетативных органов из теломов прародительских форм, как это убедительно показано многими работами [5, 23, 33, 38, 47].

Генетическая стабильность посадочного материала, полученного на основе верхушечных меристем, базируется на митотической активности апекса микрочеренка при формировании побеговой системы растения и работе камбия при формировании придаточных корней, а сама направленность протекания органогенного развития этих структур при микроклональном размножении регулируется нативными или синтетическими фитогормонами [15, 21, 29]. Разработаны соответствующие рекомендации сельскохозяйственному производству по использованию микрочеренкования при выращивании безвирусных саженцев плодовых, ягодных культур и винограда [9, 30, 35], однако и в СССР и за рубежом продолжают интенсивные исследования технологических аспектов микроклонального размножения многих древесных культур, включая и садовые, и до сих пор не ясно, следует ли микрочеренкование рассматривать в качестве ускоренного метода размножения (по [7, 17] коэффициент размножения 1 апекса может достигать 1 млн. и более) или в качестве способа оздоровления сортов и клонов многолетних растений. Полученные нами экспериментальные данные (табл. 9) позволяют считать микрочеренкование древесных культур в силу высоких затрат квалифицированного ручного труда и материальных средств технологическим приемом, направленным на освобождение единичных маточных растений от вирусной и микоплазменной инфекции, вызывающей значительное снижение продуктивности (например, при поражении черной смородины реверсией [37]). Иными словами, получение в промышленном питомниководстве безвирусного посадочного материала с использованием изучаемого метода целесообразно только при реальном снижении урожая вследствие вирусной инфекции, и необходимость его должна определяться применительно к каждому конкретному случаю (сорт, порода и зона садоводства).

О правомочности такой постановки вопроса свидетельствует и зарубежный опыт. Так, в ряде западноевропейских стран (Италия, Испания, Бельгия, Швейцария и частично Франция) отсутствует обязательная официальная сертификация саженцев садовых культур, а в Великобритании, Франции и Нидерландах сертификация и соответственно оздоровление являются обязательными только для отдельных сортов, клонов и пород с твердо выявленными симптомами инфицированности, приводящей к снижению или полной гибели урожая, а также к гибели насаждения в целом.

Генетическая однородность посадочного материала, полученного методом культуры изолированных верхушечных меристем, в отличие от культуры тканей, клеток и протопластов базируется на митотической активности апекса микропобега в цикле размножения и перестройке работы веретенновидных и лучевых инициалей камбия в цикле укоренения с последующей дифференциацией на их основе апикальных корневых меристем и затем придаточной корневой системы. О провентивном росте микропобегов в цикле размножения свидетельствует наличие непрерывной связи проводящих систем почки и микропобега с центральным цилиндром стебля исходного микрочеренка.

Из-за высоких производственных затрат (ручной квалифицированный труд, необходимость специального оборудования, лабораторий и т. д.) микроклональное размножение древесных многолетних культур в настоящее время следует, по нашему мнению, рассматривать лишь как один из способов получения здорового посадочного материала, свободного от опасных вирусных и микоплазменных возбудителей болезней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В. Г. Анатомия растений. — М.: Высш. школа, 1966. — 2. Алехно Г. Д. Клональное микроразмножение промышленных сортов розы. — Автореф. канд. дис. — М.: НИЗИСНП, 1986. — 3. Асадулаев З. М., Фаустов В. В. Ауксиновый контроль ксилемной дифференциации у древесных плодовых растений при регенерации. — В сб.: Процессы дифференциации и регенерации у изолированных тканей и органов растений. — Махачкала: Даг. ун-т, 1986, с. 53—59. — 4. Бакун Т. В. Особенности микроклонального размножения земляники. — В сб.: Проблемы вегетативного размножения. — М.: ТСХА, 1985, с. 122—128. — 5. Баранов М. П. Строение придаточных корней и влияние их развития на строение кистенно-корневых двудольных растений. — Докл. АН СССР, 1979, т. 248, № 4, с. 1011—1017. — 6. Белошапкина О. О. Сортовая реакция земляники на оздоровление методом культуры меристем. — В сб.: Проблемы вегетативного размножения. — М.: ТСХА, 1985, с. 119—122. — 7. Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. — М.: Наука, 1975. — 8. Власов Ю. И., Самсонова Л. Н., Каверзнева Г. Д. Фитомикоплазмы: классификация, диагностика и меры борьбы. — М.: ВНИИТИЭ Госагропрома СССР, 1987. — 9. Выращивание посадочного материала ягодных культур (рекомендации Госагропрома СССР). — М.: Агропромиздат, 1987. — 10. Гамалей Ю. В. Цитологические основы дифференциации ксилемы. — Л.: Наука, 1972. — 11. Гамбург К. З. Биохимия ауксина и его действие на клетки растений. — Новосибирск: Наука, 1976. — 12. Дерфлинг К. Гормоны растений — системный подход. — М.: Мир, 1985. — 13. Дмитриева Н. Н., Винникова Н. В. О ранних событиях в гормональной индукции делений при регенерации. — В сб.: Процессы дифференциации и регенерации у изолированных тканей и органов растений. — Махачкала: Даг. ун-т, 1986, с. 3—40. — 14. Жаркова И. В., Полова И. В. Особенности размножения новых сортов и элитных сеянцев земляники методом культуры меристематических верхушек. — В сб.: Прогрессивные технологии в плодоводстве и виноградарстве. — М.: ТСХА, 1982, с. 78—82. — 15. Иванов В. Б. Клеточные основы роста растений. — М.: Наука, 1974. — 16. Иванов В. Б. Пролиферация клеток в растениях. — Итоги науки и техники, сер. Цитология. Т. 5. — М.: ВИНТИ АН СССР, 1987. — 17. Катаева И. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. — М.: Наука, 1983. — 18. Келдыш М. А., Помазков Ю. И. Вирусные и микоплазменные болезни древесных растений. — М.: Наука, 1985. — 19. Колесникова А. Ф., Колесников А. И., Муханин В. Г. Вишня. — М.: Агропромиздат, 1986. — 20. Колесникова А. Ф., Михеева М. В., Трофимов Т. А. Культура вишни в средней полосе РСФСР. — В сб.: Культура вишни в средней полосе СССР. — М.: Наука, 1985, с. 10—13. — 21. Кулаева О. Н. Цитокинины, их структура и функция. — М.: Наука, 1973. — 22. Лейке Г., Лабес Р., Эртель К., Петерсдорф М. Использование культуры тканей и органов в селекции растений и производстве посадочного материала. — М.: Колос, 1980. — 23. Мейер К. И. Морфогенез высших растений. — М.: МГУ, 1958. — 24. Ницше В., Венцель Г. Гаплоиды в селекции растений. — М.: Колос, 1980. — 25. Олешко Е. В. Особенности клонального микроразмножения подвоев и сортов вишни. — Автореф. канд. дис. — М.: ТСХА, 1985. — 26. Олешко Е. В. Особенности размножения вишни in vitro. — В сб.: Культура клеток растений и биотехнология. — М.: Агропромиздат, 1986, с. 117—120. — 27. Олешко Е. В., Трушечкин В. Г., Высоцкий В. А. Размножение клоновых подвоев вишни. — Садоводство, 1983, № 3, с. 20—21. — 28. Плотникова Г. А. Культура зародышей in vitro и получение гибридных форм вишни и черешни. — Автореф. канд. дис. — М.: НИЗИСНП, 1987. — 29. Полевой В. В. Фитогормоны. — Л.: ЛГУ, 1982. — 30. Положение о производстве су-

пер-суперэлитного, суперэлитного и элитного посадочного материала, закладке и эксплуатации маточных насаждений плодовых и ягодных культур. — М.: Колос, 1984. — 31. Попова И. В., Жаркова И. В., Зекалашвили А. У. Изучение потенциальной продуктивности новых сортов земляники, размноженных методом культуры меристематических верхушек. — В сб.: Проблемы вегетативного размножения в садоводстве. — М.: ТСХА, 1985, с. 112—118. — 32. Прозина М. Н. Ботаническая микротехника. — М.: Высш. школа, 1960. — 33. Раздорский В. Ф. Архитектоника растений. — М.: Сов. наука, 1955. — 34. Ревякина Н. Т., Михеев А. М. Клоновые подвои вишни и перспективы их использования в средней полосе РСФСР. — В сб.: Культура вишни в средней полосе СССР. — М.: Наука, 1985, с. 85—91. — 35. Рекомендации по выращиванию безвирусного посадочного материала плодово-ягодных культур и винограда. — М.: Колос, 1980. — 36. Синнот Э. Морфогенез растений. — М.: ИЛ, 1963. — 37. Тарашвили З. Т. Ускоренное размножение черной и красной смородины методом *in vitro*. — Автореф. канд. дис. — М.: НИЗИСНП, 1985. — 38. Тахтаджян А. Л. Вопросы эволюционной морфологии растений. — Л.: ЛГУ, 1954. — 39. Уоринг Ф., Филлипс И. Рост растений и дифференцировка. — М.: Мир, 1984. — 40. Урбах В. Ю., Математическая статистика для биологов и медиков. — М.: АН СССР, 1963. — 41. Фаустов В. В. Регенерация и вегетативное размножение

семенных растений. — В сб.: Процессы дифференциации и регенерации у изолированных тканей и органов растений. — Махачкала: Даг. ун-т, 1986, с. 8—15. — 42. Фаустов В. В., Асадулаев З. М. Влияние системы содержания маточных насаждений и локальной этиологии на укореняемость зеленых черенков клоновых подвоев яблони. — В сб.: Регуляторы роста и удобрения в садоводстве. — М.: ТСХА, 1985, с. 64—71. — 43. Фаустов В. В., Орлов П. Н. Начальные этапы дифференциации придаточных корней у зеленых черенков садовых растений при обработке регуляторами роста. — Изв. ТСХА, 1985, вып. 4, с. 123—138. — 44. Фаустов В. В., Орлов П. Н., Асадулаев З. М. Гормональный контроль ксилемной дифференциации у зеленых черенков древесных плодовых культур. — В сб.: Регуляторы роста и удобрения в садоводстве. — М.: ТСХА, 1985, с. 50—59. — 45. Эзау К. Анатомия семенных растений. — М.: Мир, 1980. — 46. Эзау К. Анатомия растений. — М.: Мир, 1969. — 47. Bower F. O. Primitive Land plants. — L., 1935. — 48. Haberlandt G. — Sitzungsber. Acad. Wiss. Wien, 1902, N 111, S. 69—92. — 49. Koblitz H. Kulturpflanze, 1974, H. 22, S. 95—157. — 50. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473—497. — 51. White P. H. R. The cultivation of animal and plant cells. — N. Y.: Ronald Press, 1963.

Статья поступила 14 декабря 1987 г.

SUMMARY

The work was performed in 1981—1987. Cherry varieties Shubinka, Lyubskaja, Vladimirskaia, Oblachinskaja, Molodjozhnaja, Moscow Griot, Chernoskaja and VP-1, P-3 and P-7 clone stocks of this strain were investigated. Microclonal reproduction was conducted on artificial nutrient media under aseptical conditions by apical shoot meristems (200—500 mk). It is shown that the whole reproduction cycle (isolation of explant — obtaining rooted test glass plants) takes 7—8 months, while the cycle including 2—4 microshoot passages on reproduction medium — 10—12 months. High mitotic activity resulting in intensive branching and formation of branched conglomeration of buds and lateral microshoots which in total form sympodial branched microshoot system is typical for apical meristems on reproduction medium. Explant growth and branching is influenced by 6-benzilaminopurine eliminating apical domination. Additional microcutting roots on rooting medium are formed on the base of ray initials of stem cambium. Genetic stability of planting material obtained in such way is based on mitotic activity of microcutting apex and on cambium functional activity, and the trend in organogenetic development of the main vegetative organs (shoots and roots) is regulated by exogenous phytohormones.