

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ –
МСХА имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА

Факультет садоводства и ландшафтной архитектуры

Кафедра плодородства, виноградарства и виноделия

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИННОВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ВЕГЕТАТИВНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ САДОВЫХ КУЛЬТУР

Учебное пособие

Москва – 2019

УДК 634:631.532/.535 (075.8)

ББК 42.35-45я73

Б63

Рецензенты:

канд. биол. наук, доцент, руководитель отдела культурных растений
ФГБУН ГИС РАН имени Н.В. Цицина

В.А. Крючкова

канд. с.-х. наук, доцент, зав. кафедрой овощеводства
РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

А.В. Константинович

Авторы: **Деменко В.И., Акимова С.В.,
Киркач В.В., Викулина А.Н.**

Б63 Биологические основы инновационных технологий вегетативно-го размножения садовых культур: учебное пособие. – М.: МЭСХ, 2019. – 156 с.
ISBN 978-5-6042797-

В пособии представлены биологические особенности и технологии получения привитых растений, способы выращивания саженцев с использованием интеркалярных подвоев и получения привитых саженцев теплице. Показаны биологические особенности производства корнесобственного посадочного материала при размножении зелеными и одревесневшими черенками. Даны теоретические основы, возможности и проблемы технологии клонального микроразмножения садовых растений. Пошагово описана организация работ в лаборатории клонального микроразмножения.

Для магистров, обучающихся по направлению 35.04.05 «Садоводство».

Рекомендовано к изданию учебно-методической комиссией факультета садоводства и ландшафтной архитектуры (протокол № 2 от 7 октября 2019 г.).

Протокол заседания кафедры плодородства, виноградарства и виноделия № 1 от 12 сентября 2019 г.

УДК 634:631.532/.535 (075.8)
ББК 42.35-45я73

ISBN 978-5-6042797-

© Деменко В.И., Акимова С.В.,
Киркач В.В., Викулина А.Н., 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1. Биологические особенности получения привитых растений	7
1.1. Технологии получения привитых саженцев.....	23
1.2. Выращивание саженцев с использованием интеркалярных подвоев.....	37
1.3. Выращивание привитых саженцев теплице	41
1.4. Возможные сочетания полей питомника.....	45
Глава 2. Биологические особенности получения корнесобственного посадочного материала	49
2.1. Размножение садовых растений зелеными черенками.....	49
2.2. Размножение садовых растений одревесневшими черенками	59
2.3. Теоретические предпосылки получения разветвленных однолетних саженцев	65
Глава 3. Размножение садовых растений <i>in vitro</i>	69
3.1. Теоретические основы клонального микроразмножения	69
3.2. Влияние физиологически активных веществ на клональное микроразмножение растений	78
3.3. Проблемы и возможности клонального микроразмножения	79
3.4. Физиологические расстройства и возможные генетические отклонения растений <i>in vitro</i>	84
3.5. Биологические основы ризогенеза садовых растений <i>in vitro</i>	93
3.6. Адаптация растений, полученных <i>in vitro</i>	102
3.7. Методы длительного хранения <i>in vitro</i> растений в состоянии замедленного роста	112
3.8. Размножение растений искусственными семенами.....	121
Глава 4. Организация работы в лаборатории клонального микроразмножения садовых растений	123
4.1. Организация работы и оборудование.....	123
4.2. Приготовление питательных сред	126
4.3. Техника асептической работы в ламинарном боксе.....	132
4.4. Создание коллекции асептических культур <i>in vitro</i>	135
4.4.1. Этап введения в культуру <i>in vitro</i>	135
4.4.2. Этап мультипликации микропобегов.....	138
4.4.3. Этап ризогенеза микрорастений	139
4.4.4. Этап адаптации	141
4.5. Меры предосторожности при работе с химическими веществами в лаборатории	144
Библиографический список	147

ВВЕДЕНИЕ

Согласно приказу Минздравсоцразвития от 2 августа 2010 г. № 593н в Российской Федерации рекомендуемый медицинский уровень потребления плодов и ягод составляет 90–100 кг на человека в год. В 2017 г. фактическое потребление составило 59 кг на душу населения, при этом в продовольственной корзине удельный вес импортной продукции составляет 72,3%. Для сравнения этот показатель в Италии составляет 149 кг, в Нидерландах 167 кг, в Австрии 152 кг, в Великобритании – 128 кг на человека в год. Необеспеченность внутреннего рынка плодами и ягодами отечественного производства дает возможность практически беспрепятственно заполнять его зарубежной продукцией. За 2000–2013 гг. импорт плодово-ягодной продукции увеличился с 5,7 до 7,2 млн т, а затем, после введения международных санкций, в 2017 г. снизился до 6,7 млн т.

Благодаря субсидиям по программе «Стратегия развития садоводства и питомниководства Российской Федерации на период до 2020 года» в период с 2013 по 2017 г. осуществлена закладка садов на площади 61,5 тыс. га. Однако, не смотря на усиление внимания к подотрасли и увеличению субсидирования на закладку и уход за плодовыми насаждениями, негативные тенденции в развитии сохраняются и, в значительной мере, связаны с бессистемным ведением питомниководства.

Анализ современного состояния свидетельствует о том, что отечественный посадочный материал высших категорий качества при существующей материально-технической базе в кратчайшие сроки получить невозможно.

В то же время наблюдается рост импорта посадочного материала, так как крайне высока конкуренция со стороны иностранных производителей и дистрибьюторов посадочного материала иностранной селекции, имеющих современную материальную базу, отработанную систему оздоровления и сертификации посадочного материала.

В последние годы возрастают требования к используемым регуляторам роста и удобрениям. Они должны быть экологически безопасны, высокоэффективны, снижать пестицидную нагрузку на почву и растение. Одно из направлений увеличения производства экологически безопасной продукции – использование биологически активных веществ нового поколения с высокой степенью распада за короткий период.

Основы практического вегетативного размножения садовых растений были заложены 4–5 тыс. лет назад. За это время проведенные исследования позволили раскрыть многие анатомические, физиологические и биохимические процессы. Плодовые и ягодные растения размножаются в основном вегетативно. Такое размножение способствует сохранению генетических основ сорта, так как они в большинстве случаев гетерозиготные. Гетерозиготность – неоднородность наследственной основы организма. Поэтому при семенном размножении садовых растений происходит изменения сорта.

В основе вегетативного размножения лежат основные законы биологии:

- тотипотентность – способность отдельных клеток в процессе реализации заключенной в них генетической информации не только к дифференцировке, но и к развитию в целый организм;
- регенерация – восстановление организмом утраченных органов и тканей;
- апикальное доминирование – преобладание в росте верхней части растения и подавление к росту боковых почек.

Источником современного садоводства стала серия инноваций в размножении растений, и в первую очередь, вегетативного размножения. Большую часть плодовых растений можно было тиражировать только после разработки способов окулировки и прививки. Предполагается, что этому способствовало наблюдение за срастанием веток на дереве, а на окулировку подтолкнуло прорастание семян в дупле дерева.

Способы вегетативного размножения растений постоянно совершенствуются, и в настоящее время одним из самых перспективных способов ускоренного размножения является клональное микроразмножение. Биотехнология, как интегральная отрасль, может стать базой успешного выполнения приоритетных национальных проектов. Развитие сельского хозяйства в современных условиях немыслимо без агробиотехнологии. Это имеет непосредственное отношение и к питомниководству.

Клональным микроразмножением называют массовое бесполое размножение растений в культуре тканей и клеток, при котором дочерние экземпляры генетически идентичны маточному растению. Технология клонального микроразмножения позволяет работать практически круглый год и за короткий срок получать большое количество однородного посадочного материала растений. Коэффициент размножения при этом позволяет получить более тысячи растений в год из одной введенной в культуру меристемы, что в сотни раз больше, чем при использовании традиционных методов вегетативного размножения. Данная технология привлекает внимание физиологов, вирусологов, селекционеров, а также практиков и, в первую очередь, питомниководов. Растения, полученные методом *in vitro*, благодаря реювенилизации тканей более успешно размножаются традиционными способами.

В связи с этим необходимо изучать физиологические основы вегетативного размножения садовых растений для совершенствования существующих методов и технологий, а также поиска новых инновационных путей воспроизводства хозяйственно ценных и генетически стабильных сортов и гибридов.

Глава 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРИВИТЫХ РАСТЕНИЙ

Плодовые и ягодные растения размножаются в основном вегетативно. Такое размножение способствует сохранению генетических основ сорта, так как они в большинстве случаев гетерозиготные. Гетерозиготность – неоднородность наследственной основы организма. Поэтому при семенном размножении садовых растений происходят изменения сорта.

Источником современного садоводства стала серия инноваций в размножении растений, и в первую очередь, вегетативного размножения. Одомашниванию подверглись те растения, которые легко размножались черенками и корневой порослью.

Большую часть плодовых растений можно было тиражировать только после разработки способов окулировки и прививки. Предполагается, что этому способствовало наблюдение за срастанием веток на дереве, а на окулировку подтолкнуло прорастание семян в дупле дерева.

Прививка – естественное, или искусственное соединение растительных частей, при которой происходит объединение сосудисто-проводящей системы обеих или нескольких компонентов, в результате чего генетически разные части функционируют в той или иной степени как единое целое.

Основы практического вегетативного размножения садовых растений были заложены 4–5 тыс. лет назад. За это время проведенные исследования позволили раскрыть многие анатомические, физиологические и биохимические процессы, которые происходят при корнеобразовании и прививках.

Несмотря на разработку самых разнообразных методик получения корнесобственных растений (размножение зелеными и одревесневшими черенками, отводками, апомиктичными семенами, *in vitro*, искусственными семенами), прививка почкой либо черен-

ком будет основным способом размножения садовых растений в ближайшие 50 лет.

Очень трудно совместить в одном геноме все необходимые свойства корневой системы (подвоя) и надземной системы (привоя). Прививка применяется для самых разных целей. Ее используют для тиражирования идентичных клонов, получения слабо-рослых плодовых деревьев, чтобы создать сады с плотным размещением деревьев устойчивых к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам. Она позволяет сократить ювенильную фазу и ускорить вступление в плодоношение, тем самым сократить время селекционных программ, получить химеру.

Дополнительная прививка может решить проблему опыления для некоторых сортов, отремонтировать штабб дерева, заменить сорта в саду более продуктивными. Прививка используется для изучения перемещения инфекционных агентов, питательных веществ и гормонов, некоторого генетического аппарата.

Прививка широко используется в ландшафтной архитектуре, обеспечивая получение высокоштаббовых растений с плакучей формой, живую садовую мебель, функциональные древесные скульптуры.

Было опасение, что вегетативное размножение может привести к старению клона и даже к его вырождению. В настоящее время доказано, что вырождение возможно, но причиной его является заражение вирусной инфекцией, либо мутация. Другим опасением была точка зрения, что вегетативное размножение может привести к слишком длительному омоложению и позднему вступлению в плодоношение. Действительно те или иные способы вегетативного размножения могут увеличить ювенильный период в жизни растения, но они всегда возвращаются к репродуктивной фазе развития.

Описание прививки можно найти в Библии. Некоторые моменты технологий того времени актуальны и сейчас. В Греции и Италии прививку применяли в V в. до нашей эры. Была доказана воз-

возможность использовать айву в качестве подвоя для груши. Греческий философ Теофраст уже тогда отмечал на возможность получения карликовых яблонь, которые были вывезены Александром Македонским из Персии. Они стали предшественниками карликовых подвоев, которые перевернули представление о саде. Много интересного можно обнаружить по прививке в Китае. Во II в. до нашей эры уже показана возможность получения растений с несколькими корневыми системами. В разные времена можно встретить и чудачества относительно прививки. Например, если кто-то хотел получить красные яблоки, то ее нужно было привить на ольху. Для получения вишни без семян рекомендовали вбивать металлический прут, а рядом сажать кабачок, который следует привить к вишне.

XIX в. окончательно подвел черту всем чудачествам. В это время были разработаны практически все способы прививки и окулировки. Следует отметить, что прививка позволила в XIX в. спасти такую отрасль, как виноградарство от филлоксеры, а цитрусовые от фитотфторы.

Влияние подвоя на привой и наоборот эволюционировало от предположения, что привой прорастает через подвой, укореняется и после этого поставляет питательные вещества в надземную систему, до возможности получать вегетативные гибриды.

В настоящее время эти взаимодействия между подвоем и привоем значительно расширены. Они базируются на эмпирических, тонких анатомических, физиологических и биохимических результатах.

Долгое время использовались семенные подвои, которые способствовали получению максимального урожая с дерева. Плодовое растение должно было выдержать вес не менее 200–250 кг плодов на дерево, отмечен рекорд в 1500 кг плодов на дерево.

После того, как земля в Европе стала дорогой, садоводы обратили внимание на клоновые подвои. Анализ наблюдений за привойно-подвойными комбинациями и влияние этого взаимо-

действия на сорт является существенным достижением в садоводстве за последнее время. Это взаимодействие подразумевала необходимость целенаправленной селекции клоновых подвоев.

В начале XX в. такая работа была начата в Англии. Плодоводы должны быть признательны селекционерам Англии за создание подвоев устойчивых к кровавой тле, фитотфторе, некоторым вирусам. Они, создав соответствующие подвои, показали на возможность через подвои ускорять раннее и обильное плодоношение.

Ведутся исследования по созданию подвоев, которые способны решить проблему повторной посадки сада. В настоящее время большинство подвоев получено от скрещивания *Malus domestica* с 25 различными видами. Особенно часто используются *M. baccata*, *M. florebunda*, *M. florentina*, *M. prunifolia*. Не исключается получение подвоев от скрещивания с рябиной, кизильником, айвой, боярышником.

Результаты биотехнологических методов также позволяют надеяться на получение необходимых для садоводов подвоев. Например, используя корневой каллус подвоя для вишни, черешни «Кольт» было получено гексаплоидное растение. Дело в том, что «Кольт» триплоид и по этой причине стерилен, а на гексаплоидном уровне он фертилен, и его можно использовать в селекционной работе.

Отрабатывается методика слияния протоплазмы различных культур, что позволит получить синтетические подвои, например, одновременно для яблони и груши. Перенос генов с помощью агробактерии в геном карликового подвоя яблони стимулирует рост корней и при этом низкорослость надземной системы, т.е. карликовость не требующая опор в саду. Полученные подвои легко укореняются традиционными способами, они проходят испытания на предмет их влияния на рост и развитие сорта.

Следует отметить вклад нашей страны по выведению клоновых подвоев. Самая северная граница промышленного выращивания яб-

лони в США – Нью-Йорк, т.е. в нашей стране это Краснодарский край. Поэтому мы должны были создать свои подвои, корневая система которых выдерживала бы –12–14 °С, а во вторых, чтобы ее развитие укладывалось бы в наш короткий вегетационный период.

Такие подвои созданы и создаются в Мичуринске. Плодоводы ждут от селекционеров создания подвоев, которые были бы устойчивы к бактериальному ожогу, фитофторе, кровавой тле, легко размножались вертикальными отводками и при этом не имели бернот, стимулировали раннее и обильное плодоношение, положительно влияли на окраску плодов, были толерантны к низким температурам зимой, имели хорошую якорность, были технологичными в питомниководческой практике.

Эти влияния укладываются в современные представления о том, что функции корневой системы (подвоя) не только определяют поглощение и перемещение питательных веществ, но и являются местом синтеза очень важных биологически активных соединений. Эти соединения (гормоны) влияют на фенотип привоя, т.е. на его ветвление, время цветения, высоту растения.

Исследования на яблони показали, что подвой может влиять на экспрессию генома привоя, в частности М9 активизирует экспрессию генов связанных с фотосинтезом, деланием клеток, а М7 – активизирует гены сорта, связанных с реакцией на стресс.

Показано, что подвой влияет на опыление, оплодотворение и завязывание плодов. Он воздействует на жизнеспособность пыльцы и избирательную способность пестика. В зависимости от подвоя пыльца может достичь зародышевого мешка, либо остановиться в росте, что связано с различным содержанием фенолов в пестике и пыльце.

Первоначально особое внимание уделяли влиянию подвоя на силу роста привитого сорта. Позднее все подвои разделили на суперкарликовые, карликовые, полукарликовые, среднерослые, и сильнорослые подвои.

Карликовые и полукарликовые подвои обеспечивали плотность посадки деревьев в саду до 2500 и более растений на гектар. Считается, что такая плотность в настоящее время экономически целесообразна. Использование суперкарликовых подвоев с карликовыми спуровыми сортами позволяет довести плотность сада до 100 тыс./га, а урожайность сада до 500 т/га. Однако колебания климата зимой даже в Европе делают такие сады очень рискованным предприятием. В настоящее время современное садоводство отдает предпочтение деревьям на карликовых и полукарликовых подвоях.

Слаборослость привитого дерева посредством карликового подвоя осуществляется через различные механизмы и может быть вызвана, например, ранним и обильным плодоношением. Но раннее и обильное плодоношение можно получить при использовании подвоя ММ106, или 57-490.

Для карликовых подвоев характерна ранняя остановка роста надземной системы, с малой вероятностью вторичного роста, как например, на подвое М9, в то время как на подвое ММ106 очень часто надземная система склонна к вторичному росту.

Карликовые подвои имеют другое анатомическое строение, что в свою очередь связано с биохимией их корневой системой. У них больше содержится крахмала и жиров, которые инертны в питании корневой системы, выше активность ферментов разрушающих ауксин, отсюда слабо выражена сосудисто-проводящая система, больше содержится АБК и меньше гиббереллина.

Высота плодового дерева в современном саду должна обеспечить 90 % сбора урожая с земли, т.е. около 3 м. Кроме того такая высота позволяет в дальнейшем разработать соответствующую формировку и комбайн для сбора плодов. Таким образом, прививка остается общепринятым и существенным методом клонирования растений для самых различных целей широкого ряда видов.

Техника прививки развивалась от интуитивного понимания механизма происходящего при прививке до его изучения и управ-

ления. Питомниководы, используя этот механизм, создали различные способы прививки. В их основе лежит контролируемая форма повреждений и точное расположение камбиальных слоев подвоя и привоя, которое приводит к срастанию компонентов.

В течение интенсивного репродукционного процесса, камбиальные клетки имеют очень тонкую оболочку первичного строения, содержимое клеток остается текучим. По мере вхождения растения в покой камбиальные клетки становятся толще и жестче. Эта сезонная особенность определяет способы и время проведения летней окулировки, и отчасти объясняет, почему при зимней прививке раны должны быть больше.

Процесс срастания подвоя и привоя во многом напоминает зарастание ран на дереве. При срезе обрезаются сосуды, трахеиды и клетки, которые вскоре закупориваются лигнином и танинами. Это первый этап зарастания поврежденных тканей. После этого начинают делиться живые неповрежденные клетки камбия, паренхимы, которые образуют связующий каллус. В каллусе образуется новый камбий, который в свою очередь образует ксилему и флоэму.

Однако процесс срастания при прививках происходит в других условиях и в первую очередь при другой влажности, которая создается после обвязки места прививки. В условиях повышенной влажности лигнификация и суберинизация клеток раневой поверхности не происходит, деление клеток более продолжительно.

Весь процесс срастания при прививках можно разделить на ряд последовательно идущих друг за другом этапов. Прежде всего, отмечают реакцию на поранение подвоя и привоя, в результате которой образуется некротическая прослойка из травмированных клеток. Далее происходит частичное ее рассасывание. В зоне будущей прививки происходит накопление ауксина и реакция не травмированных клеток на него, сопровождающая интенсивным их делением. Образуется каллусная масса, в которой начинает развиваться раневой камбий, а затем раневая сосудисто-проводя-

щая система. В конце срастания она соединяет сосудисто-проводящую системой подвоя и привоя.

Некоторые этапы проходят очень быстро. Сразу после поранения ядро и протоплазма близлежащих к ране клеток перемещаются в сторону травмы. Продукты распада клеток влияют как раздражители на не травмированные клетки, вынуждая их делиться. Максимум реакции на травму достигает через 4–24 ч, через 48 ч в зоне увеличивается содержание ауксина, клетки начинают делиться, образуя каллус. К делению приступают даже дифференцированные клетки за исключением клеток сердцевины. Степень реакции не травмированных клеток на поранение зависит от их удаленности от места поранения. Наиболее сильно реагируют клетки первых пяти слоев. В этом месте даже повышается температура. Дальнейшее срастание зависит от наличия необходимого количества кислорода в зоне срастания, что достигается соответствующей обвязкой и правильностью срезов. В противном случае срезы подвоя и привоя приобретают коричневый цвет, что является результатом полного окисления фенолов, которые являются токсичными для живых клеток.

Для деления клеток необходимо наличие определенного количества кислорода и гормонов. Долгое время считали, что при поранении образуется особый раневой гормон. Однако в дальнейшем пришли к выводу, что соотношение уже существующих гормонов, ответственно за деление клеток и срастание.

Следует отметить, что при поранении в достаточных количествах синтезируется 2-додеценвая кислота, при нанесении которой на поверхность среза усиливается деление клеток. Клетки каллуса подвоя и привоя сильно вакуолизированы, на их поверхностях образуются выросты, происходит слипание каллусов и образуется срединная пластинка. В месте контактов идет обмен различными молекулами, если эти молекулы находятся в определенном родстве подвоя и привоя, то происходит более тесное объеди-

нение клеток каллусов. При явной несовместимости продолжительность раневой реакции увеличивается, пространство между подвоем и привоем заполняется каллусной массой, что приводит к образованию преграды и гибели привоя. Некоторое время каллусный мостик обеспечивает клетки каллуса и привоя питательными веществами. Однако вскоре внутренние клетки каллусной массы отмирают, оболочки клеток создают примитивную сосудисто-проводящую систему. Рядом расположенные клетки под влиянием гормонов превращаются в камбиальные клетки, образуется раневой камбий. Он контактирует со старыми проводящими пучками, и в первую очередь с проводящими пучками привоя. Они как раз и определяют дифференциацию недостающих участков проводящей системы. Образование каллусных клеток начинается от подвоя, а образование сосудисто-проводящей системы от привоя.

Если место прививки или окулировки срезать через несколько лет, то можно четко увидеть различие в строении ткани в этом месте, по сравнению с не привитыми участками. К этому времени той коры, которую мы травмировали в момент прививки, уже нет, она каждый год заменялась новой, но и на новой коре видны контуры старой раны, даже если были соблюдены все параметры прививки. Заложение каллусной массы идет очагами по поверхности срезов, образование раневого камбия происходит не по дуге окружности, а с тем или иным искривлением. Камбиальная клетка делится на две клетки, одна остается камбиальной, а вторая превращается в клетку ксилемы или флоэмы. Таким образом, прививка это хирургическая операция, хотя и кратковременная, но может иметь серьезные последствия. На практике это означает, что необходимо четко совмещать камбий подвоя и привоя, хотя срастание возможно, если небольшая фракция камбиальных слоев подвоя и привоя имеет контакт, но такое срастание будет еще более аномальным.

Образование раневой сосудисто-проводящей системы регулируется гормонами – ауксином и этиленом. Ауксин поставляется

из закулированной почки, или почками черенка, а этилена достаточно в результате травмы, нанесенной во время прививки. Однако необходим непосредственный контакт клеток подвоя и привоя. Между подвоем и привоем размещали биологический фильтр, который пропускал гормоны, но контакт клеток подвоя и привоя отсутствовал. В этом случае формирование сосудисто-проводящей системы со стороны подвоя не происходило. Если в фильтре делали отверстие, то раневая сосудисто-проводящая система привоя направлялась к месту отверстия и начинала развиваться сосудисто-проводящая система подвоя. Аномальное расположение сосудисто-проводящей системы зависит от типа подвоя. Карликовые подвои усиливают эту аномалию. В месте прививки отмечают скрученную флоэму, ненормальную ориентацию ксилемных лучей и значительную степень некрозов. Это может быть причиной недолговечности плодовых деревьев на слаборослых подвоях. В каллусе только что сделанной прививки могут развиваться своеобразные наросты. Они имеют сферическую форму, состоят из центра и камбиальной оболочки. Причины и функции этих наростов в месте прививки пока неизвестны. Клетки каллуса подвоя и привоя могут смешиваться. Это приводит иногда к образованию прививочной химеры. Последние исследования в области физиологии привитых растений показывают на перемещение из подвоя не только различных веществ, но и т-РНК.

Жизнеспособность и продуктивность привитых деревьев определяется в первую очередь совместимостью, или несовместимостью прививаемых компонентов. Явление несовместимости может сказаться на стандартности саженцев в питомнике и уменьшении урожайности в саду, либо способствовать гибели растений через 4–10 лет в зависимости от типа несовместимости. Следует различать факторы, которые определяют эти два явления. В основе совместимости лежит тесная генетическая взаимосвязь между подвоем и привоем, что определяет их успешное срастание. Объедине-

ние подвоя и привоя зависит также от техники исполнения, климатических условий, наличие или отсутствия болезней. При несовместимости учитывается только генетическое родство прививаемых компонентов. Причиной несовместимости могут быть физиологические и анатомические события. Те и другие способствуют отчуждению и гибели клеток в месте прививки. Несовместимость может проявиться сразу после прививки, либо через несколько лет. В последнем случае формирование основных элементов срастания может закончиться на образовании ксилемы и флоэмы, которые не превращаются в древесину и кору. После этого наступает дегенерация прививки. Превращение ксилемы и флоэмы в древесину и кору связано с отложением лигнина в оболочках клеток.

Огромную роль в этом процессе играет фермент пероксидаза, который ускоряет процесс лигнификации. Причиной несовместимости может быть различия в содержании гормонов подвоя и привоя, которые участвуют в процессе срастания, особенно на этапе дифференциации раневой сосудисто-проводящей системы. А так как взаимодействие гормонов с ферментами, фенолами и другими продуктами жизнедеятельности двух компонентов многоплановы, то можно ожидать самых неожиданных результатов в практики питомниководства. Экзогенно примененный ауксин в малых дозах стимулировал формирование флоэмы, а в больших концентрациях ксилемы у привитых растений. У несовместимых комбинаций огурца НУК, примененный в гидропонике, ухудшал развитие корневой системы в большей степени, чем у совместимых комбинациях. Применение веществ, препятствующих транспорту ауксина, сводило на нет деградацию корней у несовместимых комбинаций. Основной вывод этих немногочисленных работ заключается в том, что перемещение ауксина приходит в норму после того как образуется нормальная связь между подвоем и привоем.

Таким образом, опыты, проведенные с овощными культурами, показали на возможность получать нормальное срастание

подвоя и привоя, используя регуляторы роста. Однако насколько продолжительно будет такое взаимодействие у многолетних культур неизвестно, так как успех прививки зависит от присутствия либо отсутствия, или скорее от взаимодействия различных комбинаций синтезируемых подвоем и привоем метаболитов. Причиной отсутствия полноценного срастания подвоя и привоя могут быть вирусы. Например, грецкий орех, привитый на подвой Парадокс, на 10–12-й год ломается строго по месту прививки, где можно увидеть ткани черного цвета. Эта несовместимость получила название черная черта. Предполагают, что подвой может быть устойчивым к вирусу, а привой нет.

Степень совместимости зависит от семейства, рода, вида, сорта. Чем ближе находятся в родстве прививаемые компоненты, тем лучше совместимость. Прививка Антоновки на Антоновку всегда совместима, так как геном у них один и тот же, но сортовая прививка редко применяется в промышленном плодоводстве. Подвой это те же сорта в генетическом плане. Поэтому межсортовые прививки в плодоводстве применяются гораздо чаще. Все современные саженцы это результат межсортовых прививок. Степень срастания, последующая урожайность прививки будет, зависит от сочетания подвоя и привоя. Например, урожайность сорта Ренет Симиренко на подвое 57-257 – 418 ц/га, а на таком же по силе роста подвое 632-396 – 723 ц/га. Предполагают, что наиболее продуктивные комбинации, в которых совпадают 4 волны роста подвоя и привоя. В плодоводстве и декоративном садоводстве иногда используют межвидовые прививки. При таких прививках разброс совместимости или несовместимости будет еще больше. Очень важно при межвидовых прививках использовать соответствующие сорта и подвой.

В плодоводстве широко применяется айва, как карликовый подвой для груши, но не все сорта груши совместимы с айвой. Причиной несовместимости айвы с грушей является синтез айвой

фенола ргунасин. Он разрушает клетки ксилемы и флоэмы груши, что приводит к гибели привоя. Те сорта груши, которые совместимы с айвой, вырабатывают ферменты, которые разрушают ргунасин. В практике питомниководства используют вставки таких сортов, чтобы сохранить карликовость айвы и получить совместимую комбинацию. Были попытки использовать клоновые подвои яблони для груши. Продолжительность жизни таких деревьев была значительно короче, только на М26 для некоторых сортов груши не отмечали сокращение продолжительности жизни. Межсемейные прививки возможны среди травянистых растений, но не подтверждаются у древесных. Хотя и в этом вопросе природа опережает наши возможности. Трудно объяснить каким образом, например, омела самостоятельно прививается на грушу, яблоню, тополь, клен, дуб, пихту сосну, лиственницу. Возможно, изучив это явление, в садоводстве будут доступны и межсемейные прививки.

Существуют определенные внешние признаки, по которым можно судить о совместимости или несовместимости привойно-подвойных комбинаций. К ним следует отнести низкий процент приживаемости глазков или черенков, гибель прививок через некоторое время, увеличение объема места прививки, ранняя окраска листьев, обильное цветение, ранее или позднее начала роста весной. Признаки несовместимости могут проявляться через несколько дней после окулировки.

У совместимых комбинаций раневой камбий образуется на 12–18-й день, связь между сосудами подвоя и привоя на 20–30-й день, т.е. на 10–15 дней раньше, чем у несовместимых комбинаций. Еще быстрее такой тип несовместимости можно определить при использовании прививки *in vitro*. На четвертый день у совместимых комбинаций отмечают активное деление клеток, у несовместимых – слабая митотическая активность, появление некрозов. Несовместимость подвоя и привоя можно определить, используя физиолого-биохимические методы. У таких прививок от-

мечают отклонение от нормы содержание углеводов, общего и белкового азота, активности каталазы и пероксидазы, электрического сопротивления и электрической емкости.

Большинство типов несовместимости укладывается в схему, предложенную Коровиным: непрочное срастание древесины подвоя и привоя; точечная болезнь подвоя; голодание подвоя. При несовместимости по типу непрочного срастания древесины деревья в питомнике могут хорошо расти, в саду дожить до 7–8-летнего возраста, а затем под тяжестью урожая ломаться в месте прививки. Установить такой тип несовместимости в питомнике трудно. Детальные исследования такого типа несовместимости показали на неспособность сохранить срастание. Раневой камбий разрывался из-за временного различия активности клеток камбия подвоя и привоя.

После разрыва происходит повторное срастание, что сопровождается образованием инертной каллусной массы. Такой тип несовместимости характерен для прививки крупноплодных сортов яблони на сибирку и отдельные формы китаек. Несовместимость по типу точечная болезнь сопровождается угнетением роста надземной системы. Прирост в саду молодых растений достигает всего 2–3 см. В коре и древесине подвоя отмечают некрозы и рефленность. При этом в тканях привоя эти признаки отсутствуют. Предполагают, что такой тип несовместимости связан с отсутствием устойчивости подвоя или привоя к вирусным болезням, так как при обратных прививках признаки несовместимости исчезают. Голодание подвоя сопровождается ранним сбрасыванием листьев в питомнике, массовой закладкой цветочных почек, отмиранием корневых мочек.

Корневая система имеет одну волну роста, ее объем уменьшается. Несовместимость по типу голодание подвоя резко уменьшает зимостойкость корневой системы, а несовместимость по типу точечная болезнь – надземной системы. Плодовое дере-

во – искусственно созданное дерево. Каждая его часть (подвой, привой) может по разному относиться к условиям внешней среды, поглощая или синтезируя вещества, которые могут способствовать проявлению несовместимости и преждевременному старению всего дерева.

Мировое плодоводство базируется на применении слаборослых подвоев. Оно заинтересовано в получении высоких урожаев, а поэтому совместимость подвоев и привоев играет, и будет играть огромную роль. Исследования, которые проводились по мере закладки таких садов, показали значительный разброс в совместимости привойно-подвойных комбинаций; были показаны причины несовместимости и их последствия для промышленного плодоводства. Четко установлено, что несовместимость приводит к нарушению передвижения воды, минеральных веществ, продуктов биохимических реакций, и как результат к гибели или преждевременному старению плодового дерева. Например, прививка персика на сливу вызывает блокирование перемещение углеводов в месте прививки.

Плодовые деревья обычно создают, используя подвой и привои для более широкой адаптации сорта к почве, климату, устройству сада и увеличению его продуктивности. Почва, один из влияющих факторов, определяющих жизнеспособность привитого дерева. При этом все ее характеристики могут влиять на совместимость. Подвой для сливы Мариана 2629 устойчив к тяжелым почвам, как корнесобственное растение, но часто несовместим со многими сортами в тех же почвенных условиях. Только использование в качестве подвоя для персика миндаля можно получить жизнеспособное дерево в засушливых районах на каменистых, известковых, засоленных почвах. Гибридный подвой между персиком и миндалем показал отличную совместимость на тяжелых почвах, а продолжительность жизни абрикоса на этих почвах была незначительна, если подвоем для него был персик или сли-

ва. Таким образом, совместимость для косточковых культур приобретает, возможно, большее значение. Она является проблемой для вишни, черешни, миндаля, абрикоса; в меньшей степени для персика и сливы. Очень часто при прививках косточковых культур используются подвой, которые получены в результате отдаленной гибридизации, т.е. далеких в генетическом плане от сорта. Показано, что несовместимость у косточковых культур связано с различием в содержании фенольных соединений подвоя и привоя. Они влияют на клеточное деление клеток; нарушается баланс гормонов, отмечается сбой в работе ксилемы и флоэмы из-за отсутствия образования лигнина. Все эти ненормальности приводят к ослаблению механической прочности прививки. Существенные различия в биохимических продуктах подвоя и привоя косточковых культур сказывается на скорости срастания после прививки. У яблони каллусная масса заполняет пространство срезов через 10–14 дней, раневой камбий образуется на 21–28-й день. У косточковых культур каллус заполняет пространство между подвоем и привоем через три недели, а полноценная сосудисто-проводящая система образуется через 10 недель.

Таким образом, как для семечковых, так и для косточковых культур генетическая близость подвоя и привоя играют большую роль в их совместимости. Скорость срастания прививаемых компонентов зависит от способа срезки прививаемого глазка – с древесиной или без древесины. Срез глазка без древесины уменьшал образование каллуса, через два месяца отмечено развитие сосудисто-проводящей системы. Если щиток срезали с древесиной, то срастание было более продолжительным. Только к концу второго месяца начинала формироваться сосудисто-проводящая система. Проращение глазка зависело от прорыва некротической прослойки. Если она не рассосалась, то глазок не прорастает.

На ранних стадиях развития места срастания очень важно снабжение прививаемого подвоя водой. Недостаток воды в это

время приведет к дифференциации клеток раневых тканей, а не к делению и удлинению. Таким образом, совместимые прививки получаются в том случае, когда целый ряд ферментов подвоя и привоя работает при благоприятных и неблагоприятных условиях. В таком случае внешние условия, такие как, засуха, тяжелые почвы, низкие температуры не способны вызвать гибель привитого дерева. Поэтому подвой нужно выбирать не для породы в целом, а для отдельных сортов, или группы сортов. Причем одни и те же комбинации могут по-разному вести в различных зонах. В нашей стране с ее различиями в климате, почвенных условиях, болезнями необходима служба, которая должна заниматься изучением поведения различных привойно-подвойных комбинаций.

1.1. Технологии получения привитых саженцев

Создание привитого дерева осуществляется с помощью прививки черенком или глазком. Структура раневой сосудисто-проводящей системы зависит от способа прививки и может влиять на урожайность плодового дерева. Максимальная урожайность вишни Шубинка была получена, если однолетнее корнесобственное растение весной срезалось и прививалось той же срезанной частью. Корнесобственные растения того же сорта были менее урожайные. Сравнительная оценка урожайности груши в зависимости от способа прививки и возраста саженцев показала, что однолетние саженцы были более продуктивными, по сравнению с двухлетними саженцами, полученными через прививку черенком. Способы окулировки мало чем изменились за последние 100–150 лет.

За этот период показано влияние качества подвоев, времени проведения окулировки, роли ножа, подготовки участка, обвязочного материала. Подвои, используемые в современном плодоводстве, могут быть семенные, клоновые и апомиктичные. В настоящее время промышленное плодоводство отдает предпочтение клоновым, слаборослым подвоям (рис. 1).



Рис. 1. Маточник клоновых подвоев

Основные достоинства их – раннее и обильное плодоношение, меньший коэффициент вариации высоты плодового дерева. При использовании любого типа подвоя, его развитие должно отвечать требованиям 1–2 сорта.

После посадки подвоев в первое поле питомника наблюдается период медленного их роста. Время между пересадкой и возобновлением роста (30 дней) считается периодом приживаемости. За это время происходит увеличение количества и длины корней. Способность к росту корней уменьшается при неправильном хранении подвоев, подсушивании, промерзании (рис. 2).



Рис. 2. Подвои подготовленные для прививки

Подвои с мочковатой корневой системой приживались на 74 %, а с тремя латеральными корнями на 40 %. На приживаемость подвоев и последующую силу их роста может влиять дефолиация в школке сеянцев. Применение ауксина увеличивала потенциальный рост корней и побегов у пересаженных подвоев. Можно ожидать, что применение антагониста ауксина – 4-хлорфенокси изомаслянной кислоты будет стимулировать рост корней в большей мере, чем обработка ауксином. Особенно важно поддерживать необходимую влажность почвы. При влажности почвы 80 % приживаемость подвоев достигала 97 %, без орошения – 65,4 %. Влажность почвы влияла на приживаемость глазков и их перезимовку. Окулировка долгое время была основным способом тиражирования привитых плодовых растений. Преимущество его перед прививкой черенком связано со скоростью исполнения, меньшей потребностью в привойном материале. Однако он ограничен по времени использования.

Окулировку проводят почти исключительно в летние месяцы, либо ранней весной. Некоторые культуры окулируют зимой, например хурму. В этот период на срезе не образуется пленка танинов. За 5–7 дней до окулировки проводят полив, а также подкормку мочевиной, что стимулирует активность камбия подвоя. За 2–3 дня до окулировки проводят подчистку штамбиков, вырезая боковые разветвления на высоте 15 см у семенных подвоев и не менее 25 см у клоновых подвоев. Между диаметром в месте окулировки, диаметром будущего саженца, а также урожайностью деревьев существует положительная коррелятивная взаимосвязь. Долгое время считалось, что окулировку нужно проводить в корневую шейку, так как она лучше защищена от низких температур и предотвращает порослевость подвоев.

С открытием фитопфторозного увядания плодовых деревьев, а также возможности перехода деревьев на корни сорта, семенные подвои окулируют на высоте 5–10 см, а клоновые на высоте 25 см

(рис. 3). Преимущества низкорослых деревьев доказано многолетней практикой. Однако их якорность требует использования в саду шпалеры, что удорожает стоимость закладки сада на 30 %.



Рис. 3. Поле однолеток яблони и вишни

Оказалось, что высокая окулировка среднерослых подвоев яблони на высоте 40–60 см уменьшала размер дерева до размера на подвое М9, сохраняя все преимущества корневой системы среднерослого подвоя. Использование такого способа окулировки возможно с различными привойно-подвойными комбинациями. В то же время окулировка 13 клоновых подвоев вишни на высоте 15–90 см показала, что объем кроны был максимальным, когда прививали на высоте 75 см, а урожайность – на высоте 60 см. Установлено, что чем подвой более карликовый, тем ниже должна быть окулировка вишни. Высокая окулировка черешни также влияла на силу роста и урожайность деревьев. Максимальное сокращение высоты дерева (9,4 %) отмечено при окулировке на высоте 60, 40 см, а максимальный урожай при окулировке на высоте 40 см. Сроки окулировки зависят от начала и окончания сокодвижения у подвоя.

У семечковых культур, более раннее окончание сокодвижения, отмечено для груши, у косточковых – антипки, алычи, абрикоса, дикой черешни, персика. Поэтому окулировку этих культур начинают в аналогичной последовательности. Клоновые подвои окулируют раньше, чем семенные. Очередность окулировки кло-

новых подвоев яблони проводят в следующей последовательности: М9, М3, Б9, М4, М7, А2, М2, М26, ММ10,6. Если в питомнике выращивают различные культуры, то вначале окулируют антипку, а затем алычу, абрикос, черешню, миндаль персик, грушу, яблоню айву. Окулировку вишни нужно заканчивать за 20–25 дней до средней многолетней даты прекращения сокодвижения используемого подвоя.

Различия в результатах окулировки связывают с температурой в момент окулировки и сразу после нее, что в свою очередь обусловлено интенсивностью деления камбия. Приживаемость глазков заметно уменьшалась, когда среднесуточная температура воздуха снижалась до +10–15 °С. Температура +15 °С, это температурный порог приживаемости глазков, при котором срастание идет медленно, а при недостатке воды совсем прекращается. Данную проблему можно частично решить, применяя регуляторы роста, которые будут стимулировать клеточное деление при такой температуре. Скорость работы хорошего окулировщика такова, что ему требуется два «обвязчика». Сократить их количество можно, если использовать специальные зажимы, либо специальные резинки, либо пленку «парафильм», либо трубки.

Черенки для окулировки заготавливают в утренние часы со специальных маточников. После заготовки у них удаляют листья не оставляя черешков, так как в настоящее время окулировку проводят «с ножа». Черенки можно хранить при температуре +1–3 °С не более 10 дней. Длина заготовленных побегов зависит от культуры. Для вишни она должна быть не менее 40–45 см, так как при такой длине все почки будут вегетативными. Для остальных культур – 35–40 см. Количество почек, пригодных для окулировки при такой длине – 5–8 шт. Для яблони и сливы используют почки со средней части черенка, у груши – с верхней и средней части, у персика используют тройные почки, из которых средняя является ростовой.

Существует несколько способов срезки глазков: глазок с древесиной, глазок без древесины, глазок в виде дудки. Длина срезанного щитка должна составлять 2,5–3 см, ширина 5–7 мм, толщина срезанной древесины на щитке не более 1 мм. Слишком толстая древесина на щитке препятствует совпадению камбия подвоя и привоя. При толстой древесине в интермедиальной ткани под древесиной образуются очаги вторичной меристемы, которые образуют с камбием подвоя единое кольцо, в результате чего глазок оказывается отторгнутым от подвоя. Весной такой глазок не прорастает, хотя по осенней ревизии его считают прижившимся. При окулировке без древесины, площадь соприкосновения камбия подвоя и привоя увеличивается, что положительно сказывается на приживаемости щитков.

Существует несколько способов заготовки щитков: косой срез под почкой, либо глубокий зарез под почкой. В любом случае необходим обязательный контроль за местом обрыва сосудисто-проводящей системы почки. Если сосудисто-проводящие пучки почки остаются на черенке, то такие щитки использовать нельзя. В зависимости от типа среза на подвое окулировку выполняют либо в Т-образный зарез, либо вприклад. Окулировку в Т-образный зарез проводят при активном сокодвижении, когда кора подвоя легко отделяется, т.е. время ее проведения ограничено. Отмечают, что если кора слишком толстая, то образуется много каллуса и глазок может «заплыть». Саженцы, полученные после Т-образной окулировки, часто не выровнены по своему развитию.

Способ, который решает отчасти эти проблемы, является окулировка вприклад, не смотря на то, что ему 100–150 лет, преимущества такого способа оценены относительно недавно. Его исполнение занимает промежуточное положение между прививкой черенком и окулировкой. Во-первых, он не требует хорошего отделения коры, его можно применять весной на подвоях, не принявших летнюю окулировку, либо на подвоях не подходящих для

весенней прививки черенком. Успех весенней окулировки вприклад зависит от того насколько быстро развивается каллус, что в свою очередь связано с температурой. Подсчет суммы активных температур показывает, что успешное срастание возможно, если она равна 300–350 °С.

В начале сезона, для такой окулировки используют глазки хранившихся черенков, либо глазки черенков с зимней прививки. В последнем случае по своему физиологическому состоянию они равны черенкам для летней окулировки. Основное достоинство окулировки в приклад – скорость исполнения и возможность более длительного по времени проведения окулировки. Анатомические исследования срастания окулировки в Т-образный разрез и вприклад показали, что в первом случае образуется больше каллуса, раневой камбий развивается позже, но его протяженность короче, по сравнению с окулировкой вприклад. Большая протяженность раневого камбия при окулировке вприклад стимулирует большее образование новой ксилемы и флоэмы. Объединение подвоя и привоя при таком способе окулировки происходит на 2–3 недели быстрее. Если таким способом окулируются подвои с толстой корой, то необходимо более тщательное размещение щитка. Между срезом на подвое и вставленным щитком необходимо оставлять с обеих сторон щитка полоску шириной 1 мм либо окулировать по методу Фокастера.

Анатомические различия в срастании сказываются на развитии саженцев. Саженцы, полученные на основе окулировки вприклад, на следующий год после окулировки, ветвятся сильнее. На пяти типах подвоев яблони окулировка вприклад увеличила количество ветвящихся саженцев в 2–3 раза. В свою очередь, побеги развившиеся на саженцах увеличили силу роста корневой системы яблони и вишни. Повышение приживаемости глазков отмечено для яблони и вишни, для груши способ окулировки не влиял на приживаемость глазков. Некоторые неудачи при окулировке

вприклад связывают с чрезмерным выделением сока на подвое. Попытки снизить его выделение подрезкой корневой системы до окулировки, сократили приживаемость на 28 %.

Окулировки вприклад уменьшает потерю саженцев от обыкновенного рака, так как споры расположенные на почке щитка не проникают на поверхность среза подвоя. Обвязку снимают через 3–4 недели после любого способа окулировки и одновременно проводят ревизию приживаемости. Прижившийся глазок отличается зеленым цветом, по краям имеет место каллусная полоска. Выпады глазков зимой связаны в основном с неполным срастанием компонентов окулировки. Процесс срастания ограничивается развитием камбия, который отличается меньшей зимостойкостью. Кроме того причиной выпадов может быть чрезмерное развитие каллуса.

Большое значение для получения стандартных саженцев играет время срезки подвоев «на шип». В настоящее время саженцы выращивают с шипом, или баз шипа, когда надземную часть подвоя срезают рядом с заокулированным глазком. Наличие шипа связано со способом окулировки. При окулировки в Т-образный разрез без шипа развиваются изогнутые однолетки. Шип может служить опорой для подвязки растущего окулянта. Опыты, проведенные в Англии, показывают, что если шип оставлять до июля месяца, то это ингибирует развитие боковых побегов внизу и стимулирует в верхней части окулянта, как только шип удаляли. Особенно такое развитие наблюдали у груши и вишни. Развитие боковых побегов у яблони ингибировалось, если боковые побеги оставляли на шипе и ниже места прививки. Присутствие поросли у подвоя способствует развитию окулянта под определенным углом, который невозможно исправить с помощью подвязки к шипу. Время срезки подвоев на заокулированный глазок оказывает большое влияние на зарастание раны и последующий рост окулянта. При этом оптимальные сроки для разных сортов будут различными. Максимальный рост окулянтов черешни, вишни, сливы, яблони, груши был при срезке

подвоев в конце марта начале апреля. В этот период во втором поле питомника отмечают набухание почек, раздвижение чешуек, появление зеленого конуса, т.е. запас питательных веществ из корневой системы был направлен на привитой глазок. Если срез подвоя делали во время начала активного роста побегов во втором поле питомника, рост окулянтов резко снижался.

Несмотря на большой период с момента создания способов окулировки, мало что изменилось в самой методике ее проведения. Те отличия, которые можно отметить, касаются в основном длины щитка и места его расположения на подвое. Единственное принципиальное отличие, которое появилось совсем недавно – это окулировка «клином» с толстым слоем древесины. Данный способ в большей мере подходит под описание летней прививки черенком.

Конечно, его необходимо исследовать, чтобы ответить на такие вопросы, как скорость операции, процент приживаемости, урожайность полученных саженцев. Работа в питомнике требует высокой квалификации труда, при этом привлечение сезонных рабочих не обеспечивает высокую производительность и качество работы. Одна из проблем работы квалифицированных рабочих при окулировке – сезонность труда.

Решить эту проблему можно только используя в больших масштабах зимнюю прививку. Если сравнить затраты на производство саженцев способом окулировки и зимней прививки, то они примерно одинаковые. Но зимняя прививка позволяет перенести ее на зимний период. Кроме того она хорошо сочетается с выращиванием саженцев со вставкой и закрытой корневой системой.

Зимняя прививка известна давно, в отечественной литературе она описана в 1890 г. Уже тогда отмечали преимущества зимней прививки, по причине гибели заокулированных глазков зимой. Несмотря на то, что в Европе и США зимняя прививка использовалась в больших масштабах, в нашей стране были ее противники. Причина таких разногласий связана с различиями в климатических

условиях, короткий вегетационный период в нашей стране не обеспечивал получение стандартного однолетнего саженца за один год. Наиболее широкое применение зимняя прививка получила при получении саженцев винограда, яблони и цитрусовых (рис. 4).

При этом слива была единственной косточковой культурой, саженцы которой получались через зимнюю прививку. Успех прививки зависел от индивидуального подхода даже к сортам одной породы. Например, при одной технологии и одних режимах процент удачной зимней прививки для разных сортов яблони колебался от 25 до 70 %. Таким образом, требовались серьезные исследования по данному вопросу. Прежде всего, стало понятным, что зимняя прививка позволяет реально управлять процессами срастания в отличие от окулировки. Более того она значительно расширяет и ускоряет возможности получения саженцев со вставкой.



Рис. 4. Доращивание зимних прививок семечковых культур в защищенном грунте

Было показано, что успех зимней прививки во многом зависит от сроков проведения. При этом лучшие результаты были получены, когда зимняя прививка выполнялась в период глубокого покоя. Дальнейшие исследования позволили расширить период проведения прививки в течение всей зимы за исключением начала

февраля, когда компоненты прививки выходят из состояния глубокого покоя. В феврале приживаемость у яблони может уменьшиться на 50 %, а у вишни на 17 %. Поэтому целесообразно дать определение органическому покою. Период покоя – важнейшее свойство многолетних растений, делится на глубокий, который начинается в августе, сентябре и заканчивается в январе, феврале, и внутренний – с окончания глубокого покоя и продолжается до начала вегетации. На вступление в покой влияет длина дня и температура, на выход из глубокого покоя – температура и отчасти длина дня. Растения проходят период глубокого покоя при температуре 0–10 °С. Оптимальной считается температура 7,2 °С. Физиологические исследования показали, что выход растений из органического покоя наступает, когда вес почек увеличивается на 25 %. Очевидно, что при надлежащих исследованиях этот показатель может быть критерием и использоваться при зимней прививке. Успех зимней прививки, как и окулировки, зависит от степени развития подвоя, необходимо использовать подвой только первого сорта. Диаметр корневой шейки семенных подвоев должен быть в пределах 7–12 мм, а прививка на клоновых подвоях должна проводиться на высоте 30–35 см.

Хранение подвоев осуществляют при температуре 0–2 °С, влажности 96–98 % при обязательной циркуляции воздуха. Побеги будущих черенков заготавливают осенью после небольших заморозков, со специальных маточников. Длина побегов 40–70 см, они должны иметь хорошо сформированные почки. Основная задача хранения побегов должна быть направлена на предотвращение преждевременного пробуждения почек и просыхания. Температура хранения 0–2 °С. Более низкая температура задерживает распускание почек, как вовремя срастания прививок, так и после посадки прививок в поле. Опыты, связанные с хранением черенков показывают, что они могут храниться два года, если их обработать бенлатом, завернуть в пленку, постепенно снижать темпе-

ратуру до –10 °С, а затем довести температуру до –80 °С. После такого способа подготовки черенков флоэма и камбий оставались живы, а черенки могли использоваться для прививки. Хорошие результаты зимней прививки отмечают при хранении подвоев и черенков способом снегования.

Прививку яблони проводят с ноября до середины апреля – способом улучшенной копулировки, или вприклад. Длина среза должна быть в 4 раза больше толщины, вследствие меньшей активности камбия, по сравнению со сроками окулировки. Предполагали, что срастание привоя и подвоя будет, зависит от длины прививаемого черенка, что связывали с количеством углеводов и производством почками ауксина. Опыты с 2–6 почками на черенке не показали существенных различий в проценте приживаемости, окружности штамба однолетнего саженца и его высоты. Плотная обвязка места прививки и парафинирование привитого черенка является обязательным условием успешного срастания. Добавление в парафин ИМК (10 мг/л) и антисептика улучшает срастание прививок. Заслуживает внимания испытание на плодовых положительных результатов стратификации виноградных прививок в полиэтиленовом бандеже, что задерживает развитие почек на черенке. Воздействие высоких температур (стратификация) на привитые компоненты зависит от времени проведения стратификации. Наиболее длительный период стратификации (+21 °С) в момент голубого покоя. За этот период прививка должна набрать 300 °С. Самый короткий период 7–8 дней, в момент стратификации, когда привой и подвой вышли из состояния глубокого покоя. От продолжительности стратификации зависит приживаемость прививок.

Для яблони в ноябре она должна составлять не менее 86 %, в феврале не менее 75 %, в марте, апреле около 80 %. После стратификации прививки хранят при температуре 0–1 °С. Температура хранения +3 °С и выше стимулирует ростовые процессы, кроме того возникают проблемы с фитосанитарией. Снижение темпера-

туры до -6°C вызывает повреждение каллуса. Для лучшего срастания компонентов подвой перед прививкой переносят в помещение с температурой $+5-10^{\circ}\text{C}$, а черенки замачивают в воде при температуре $+15-18^{\circ}\text{C}$. Обработка привоя комплексом микроэлементов солей титана, хрома, марганца, никеля в концентрации 10^{-10} М раствора ускоряло образование кругового каллуса и сосудисто-проводящей системы. Положительные результаты были отмечены в опытах с производными пиридина в концентрации 0,03 % раствора, а также при обработке апикальной части прививки гетероауксина 1–2 с, в концентрации 0,05–0,1 % раствора. Большой ущерб срастанию, в процессе стратификации, могут принести грибковые болезни, вследствие создания благоприятных для их развития условий. Особенно часто прививки в это время поражаются ботритисом, поэтому обработка прививок хинозолом, топсином (0,1 %), или фундазолом (0,2 %) увеличивает количество прижившихся прививок. Желательно использовать в качестве субстрата при стратификации торф с рН 7, который уменьшает развитие грибковой инфекции.

Следует отметить, что срастание прививок яблони происходит как при низкой температуре ($+5^{\circ}\text{C}$), так и при высокой ($+30^{\circ}\text{C}$). Хорошие результаты были получены, если первые 4–6 дней стратификацию проводили при $+25-30^{\circ}\text{C}$ с последующим понижением до $+5-10^{\circ}\text{C}$ в течение 8–10 дней. Есть положительные опыты зимней прививки яблони без стратификации, когда сразу прививки помещаются на хранение при температуре $-1-2^{\circ}\text{C}$, а посадку в поле проводят, когда температура почвы достигнет $+6^{\circ}\text{C}$. Рост таких прививок начинается на две недели позже. Следует отметить, что прогревание всей прививки стимулирует к росту боковые почки. Поэтому локальное прогревание только места прививки при температуре $+24^{\circ}\text{C}$, 28 дней дало положительные результаты в опытах с фундуком. Корни и привой, согласно данной технологии, должны находиться при температуре

$+5^{\circ}\text{C}$. В нашей зоне прививки не достигают в своем развитии стандартной однолетки. Поэтому весной следующего года их срезают на обратный рост. Важным технологическим моментом следует признать выломку второго, более слабого побега на прививке, не допуская его отрастания более чем 20 см, в это же время необходимо удалить, либо ослабить обвязку. Особую значимость зимняя прививка представляет для вишни из-за поражения коккомикозом подвоев и сортов, и как результат низкий процент приживаемости при окулировке.

Многие моменты зимней прививки яблони и вишни совпадают, это касается хранения и подготовки подвоев и привоев к зимней прививке. Прививку вишни в отличие от яблони, лучше проводить с ноября до середины февраля. Стратификацию прививок проводят при температуре $+29-32^{\circ}\text{C}$ в течение 90–120 ч, влажности воздуха около 100 %. Окончание стратификации совпадает с появлением зеленого конуса у почек привоя. Хранят стратифицированные прививки при температуре $0-2^{\circ}\text{C}$.

Однако, в отличие от яблони, вишня по-другому реагирует на процесс прививки. Следует отметить, что сок у вишни, при поранении, окисляется быстрее, поэтому прививку нужно проводить быстро, особенно наложение пленки. Реакция на поранение у вишни более слабая, чем у яблони, т.е. к делению не разрушенные клетки приступают менее активно, но при этом «болевым шоком» у вишни сохраняется дольше. Известно, что если рост привоя наступает раньше роста подвоя, т.е. до прививки, каллус образуется по периферии прививки и не образуется внутри, такие побеги затем массово отламываются. В связи с этим предприняты существенные изменения подготовки и стратификации прививок. Было установлено, что для вишни особенно важен интервал температур, при котором проходит срастание. Температуры, находящиеся за пределами нижнего и верхнего порога интервала, отрицательно влияют на срастание компонентов прививки.

Проведенные опыты с различными температурными обработками привоя и подвоя, а затем и самих прививок, выявили оптимальные варианты. Суть лучших вариантов сводится к следующим воздействиям: за сутки до прививки подвой и привой прогреваются воздухом с температурой +17–20 °С с продолжительностью 24 ч, при этом компоненты должны находиться во влажном состоянии. После прививки, их вновь подвергают воздушному обогреву в течение 24–48 ч, и стратифицируют при температуре +18–20 °С. При соблюдении данного температурного режима выход саженцев составил 65–70 % против 45–55 % в контроле.

1.2. Выращивание саженцев с использованием интеркалярных подвоев

До сих пор не удалось создать идеальный подвой, который бы имел положительное влияние на урожай, устойчивость к болезням, адаптацию к окружающей среде, и при этом мог контролировать рост плодового дерева. Известно, что экономика садоводческой отрасли напрямую зависит от интенсивных садов. В странах Европы за последнее время площадь садов уменьшилась в два раза, а валовый сбор при этом увеличился тоже в два раза, за счет использования слаборослых подвоев. Такие сады обеспечивают товарное производство на 3–4-й год, быстро возвращают вложенный капитал, увеличивают продуктивность сада в 1,5–2 раза, уменьшают затраты, снижают расходы пестицидов и удобрений и сокращают цикл эксплуатации сада. Единственная проблема интенсивных садов – необходимость установки шпалер, которые в общих затратах занимают 30 %.

На текущий момент можно реально говорить об интенсивном саде без применения опор, только если использовать саженцы со вставкой. В Италии уже около 40 % садов заложены такими саженцами, хотя их стоимость на 40 % больше обычного саженца. Для хорошей якорности плодового дерева нужна мощная корневая сис-

тема, но она провоцирует сильный рост надземной системы, что идет в разрез с тенденцией современного садоводства. Поэтому питомниководы стали производить растения, используя между подвоем и привоем карликовую вставку, или интеркалярный подвой.

Причины такого влияния до конца не выяснены. Однако установлено влияние вставки на скорость прохождения в двух направлениях элементов питания. Вставка изменяет гормональный статус всего растения. Например, гиббереллин, меченный по углероду, вводили через ксилему, при этом вставка подвоя М9 значительно сократила его количество и транспорт в растении, удерживая большую часть гиббереллина и не пропуская его в надземную систему, по сравнению со вставкой подвоя ММ115.

Также известно, что вставка способствует разрушению ауксина, в связи с этим, диаметр штамба дерева с карликовой вставкой меньше, чем у растения без нее. Однако высота деревьев некоторых сортов с карликовой вставкой М9 и Б9 была аналогична высоте деревьев без вставки. Продукты обмена между подвоем и привоем, проходя вставку, претерпевают изменения, поэтому длина вставки должна быть одинаковой, в противном случае высота деревьев будет различной. Испытание длины вставки 10, 20, 30 и 40 см повлияло на снижение высоты дерева на 85, 64, 57, 52 %. В литературе встречаются примеры, когда вставка длиной до 10 см усиливала рост растения и уменьшала урожайность. Помимо влияния на рост, вставка позволяет ускорить вступление саженца в плодоношение, что очень важно для нашей зоны, так как подвой М27 отличается недостаточной зимостойкостью. Применяя разные вставки, было показано, что самое раннее цветение гибридов на третий год получено при использовании вставки П-22.

Урожайность трехкомпонентного дерева зависит от типа вставки. При использовании в качестве вставки девяти различных по силе роста подвоев, максимальный урожай с дерева был получен при использовании вставки ММ106 и 54-118, а с гектара от

вставки Б9. Каждая из прививаемых частей дерева сохраняет некоторые свои физиологические свойства, в связи с этим, характер зимостойкости плодового дерева со вставкой усложняется. Так, в суровую зиму 1968–1969 гг. погибло 70 % деревьев сорта Пепин шафранный на вставке Б9, 33 % на вставке ПК-14 и только 8 % без вставки. Повысить зимостойкость дерева со вставкой можно, если ее окучить землей или заглубить в почву на 6–7 см. В районах с суровыми зимами нужно использовать более зимостойкие вставки, следует отдавать предпочтение подвоям Степанова, так как при их создании использовалась яблоня сибирская. Надземные системы сорта Антоновка, Лобо, Северный синап со вставками 3-3-72, 3-4-73, 3-6-3, 3-6-47, 3-17-98 были проморожены при температуре –35–40 °С. Степень повреждения зависела от морозостойкости сорта и вставки, менее морозостойкие сорта при этом снижали морозостойкость вставки.

Установлено, что карликовая вставка в первую очередь ослабляет корневую систему, изменяя ее расположение в почве, чем более слаборослая вставка, тем более поверхностно развивается корневая система. Вставка должна обладать слабой укореняемостью, либо развивать корни, хорошо закрепляющие дерево в почве. Потери деревьев в саду в благоприятных районах в основном связаны с повреждениями мышами. Например, через семь лет после посадки сохранилось 100 % деревьев со вставкой 3-372, 96 % со вставкой 57-366 и 69 % со вставкой 57-491.

Вставка позволяет использовать несовместимые комбинации, например с китайкой, например сочетание китайки со вставкой М9 и сортом. В последнее время интерес к промежуточным вставкам яблони возрос, особенно для сочетания с сильнорослыми клоновыми подвоями. Получаемые деревья легко управляемы, отличаются хорошей урожайностью плодов высокого качества. При использовании сильно карликовых вставок и сильнорослых подвоев может излишне развиваться корневая поросль. Практически

все деревья со вставками М9 и Б9 к 12-му году имели корневую поросль. Отмечено, что деревья со вставкой М7, ММ106 и М4 не давали корневую поросль с сортом Макинтош, если сильнорослым подвоем были сеянцы Антоновки.

Показано влияние вставки на периодичность плодоношения. Регулярные урожаи отмечены при использовании сенцев Антоновки и вставки М9 и Б9, а периодичность плодоношения при использовании подвоя М11 и вставки М4. С биологической точки зрения одним из недостатков деревьев со вставками является утрата центрального проводника, что создаёт определенные трудности при интенсивных формировках, например веретеновидных кустов.

Также ведутся исследования по использованию вставок для других плодовых культур. Например, у черешни вставка ВП-1 уменьшала высоту дерева на 68 см, сорта вишни Цыганка на 80 см. Для груши используют вставки айвы, а для несовместимых с айвой сортов используют между айвой и сортом вставку сорта груши сорта Бере Хауди. В районах с бактериальным ожогом только использование вставки груши сорта Олд Хоум позволяет защитить надземную систему от этого заболевания. На вишне проходит испытание вставки клонового подвоя Т-5. Опыты со сливой показали, что максимальное снижение высоты дерева (1,7 раза) получено при использовании вставки ВСВ-1, а увеличение урожайности при использовании вставок Аку2-3, «Весеннее пламя» и ВСАР-4.

Существует несколько способов получения саженцев со вставкой:

- окулировка подвоя в первом поле питомника вставкой, а затем окулировка сортом. При таком способе трудно выдержать одинаковую длину вставки и возрастают потери при двух окулировках;

- двойная зимняя прививка вставкой, сортом приводит к увеличению длины и потерям при стратификации;

- окулировка в маточнике клоновых подвоев сортом и зимняя прививка уже готовым черенком не обеспечивает одинаковое развитие вставки.

Наибольшая рентабельность и синхронное развитие саженцев получена при сочетании зимней прививки вставки и весенней прививки сортом.

1.3. Выращивание привитых саженцев теплице

Сила роста прививок в открытом грунте зависит от сорта, подвоя агротехники. В условиях средней полосы за один вегетационный период можно получить стандартные однолетние саженцы только сильнорослых сортов яблони и сливы. В связи с этим, выращивание зимних прививок в условиях пленочных теплиц позволяет увеличить выход стандартных однолеток за один сезон. Подготовка теплицы для их выращивания предусматривает внесение органики не менее 120 т/га, 90–120 кг/га РК. В конце февраля начале марта теплицу накрывают пленкой, после того как почва прогреется на глубине 10 см до 12 °С, проводят посадку прививок. Плотность посадки может достигать 200–250 тыс./га.

Условия теплицы обеспечивают прирост 2 см в сутки и к осени саженцы достигают высоты 120–140 см, при этом имеют диаметр штамба 7–11 мм. Выход стандартных саженцев составляет 50–70 % при посадке прививок 15 марта – 10 апреля. Уход за растениями сводится к поливу, рыхлению, удалению цветков, поросли и обвязки, проветриванию при температуре в теплице +30–32 °С, применению гербицидов. Для получения разветвленных саженцев проводят их пинцировку при достижении высоты яблони 35–50 см, сливы 60–70 см, вишни 45–60 см. Кроме пинцировки ветвлению саженцев стимулирует удаление 2–3 листьев верхушки и удаление 2–3 нижерасположенных почек. Одним из недостатков выращивания саженцев в теплице является их не выравненность. Такие различия характерны для всех культур. Чтобы выровнять

силу роста саженцев, пинцировку следует проводить только у сильно растущих прививок. Корневая система саженцев, выращенных в теплице в 1,5–1,7 раза больше, чем корневая система растений из открытого грунта.

При выращивании зимних прививок в условиях пленочных теплиц может возникнуть проблема почвоутомления, что приводит к снижению роста саженцев на 10–20 %. В грунт попадает огромное количество опада листьев и корневой системы, в связи с этим в теплице создается специфическая почвенная микрофлора. Повышенная влажность грунта стимулирует развитие анаэробной микрофлоры, особенно часто в таких условиях развиваются грибы рода *Fusarium* sp. Для уменьшения почвоутомления необходимо вводить культурооборот, например, после косточковых выращивать семячковые культуры, а также проводить фумигацию почвы или обработку паром. В связи с этими трудностями, в настоящее время большую часть посадочного материала, в том числе и плодовых культур, выращивают с закрытой корневой системой. Он позволяет значительно увеличить сроки закладки сада; при его выращивании эффективнее используются удобрения и ядохимикаты, а также можно механизировать большую часть технологического процесса.

Важной составляющей выращивания посадочного материала с закрытой корневой системой является субстрат. Уже в самом начале разработки такой технологии была отмечена невозможность использования почвы в чистом виде. С целью улучшения физических свойств в субстрат добавляют такие материалы, как компостированные листья, перепревший навоз, отходы пивоваренной промышленности, опилки, кору, торф, песок и перлит. Известен способ добавления в субстрат глину, которая улучшает питание растений, но субстрат получается тяжелым. В настоящее время в качестве компонента субстрата используют измельченные волокна и кожуру кокосового ореха, они позволяют долгое время сохранять структуру

субстрата, подавлять патогенную микрофлору, положительно влияют на его влагоёмкость и воздухопроницаемость. Внесение органического материала делает субстрат более легким, а незначительное содержание в нем питательных веществ позволяет создать управляемую систему питания растений.

Однако органические материалы могут выделять токсичные вещества, создать в дальнейшем дефицит азота для растений, поэтому перед смешиванием они должны быть прокомпостированы не менее 12 недель. За это время в центре штабеля температура достигает 60 °С, а количество выделяемых токсичных веществ уменьшается на порядок. После компостирования добавляют азот из расчета 1,8 кг/м опилок и 3,6 кг/м коры. Количество удобрений, вносимых в субстрат, зависит от вида растений и от обменной катионной способности субстрата. В зависимости от процентного содержания в субстрате торфа (25–50 %) песка, либо вермикулита, обменная катионная способность варьирует от 8,01 мг-экв/100 г субстрата, до 140,96 мг-экв/100 г субстрата. Максимальное значение отмечено для субстрата, содержащего 50 % торфа и 50 % вермикулита. Анионная обменная способность субстрата на основе торфа отличается от почвы, так как фосфор представлен растворимой формой, а поэтому остается доступным для растений. Яблоню, сливу, вишню, черешню можно выращивать на чистом верховом торфе. Для яблони субстрат должен иметь pH 4,5–5,5, содержать $N_{100}P_{180}K_{100}$ мг/100 г субстрата. Косточковые культуры лучше растут при pH субстрата 5,5–6,5 и содержании в нем $N_{200}P_{60}K_{170}$ мг/100 г субстрата. В качестве субстрата для яблони можно рекомендовать смесь торфа с опилками 3:1, в который необходимо добавить 5 кг удобрения 18-6-12 + 2,3 кг суперфосфата + 1,1 кг сернокислого калия + 2 кг доломитовой муки на 1 м³.

Длительное выращивание посадочного материала в контейнерах часто вызывает дефицит того или иного элемента, что мож-

но компенсировать только с помощью подкормок. Концентрация, частота подкормок зависит от интенсивности роста, удобрений внесенных в субстрат системы орошения. Максимальное количество, внесенного элемента не должно превышать N200, P15, K150, Mg15 мг/л. Для жидких подкормок подходят следующие соли – NH_4NO_3 , $NH_4H_2PO_4$, KNO_3 . и мочевины. Жидкие подкормки азотными соединениями могут вызвать засоление субстрата, они располагаются в следующей последовательности – сульфат аммония, азотнокислый кальций, нитрат аммония, азотнокислый калий, мочевины. Проблемы с фосфором при жидких подкормках связаны с возможностью выпадения фосфора в осадок, что может забить оросительную систему. Для предотвращения выпадения в осадок, в раствор добавляют трилон-Б в концентрации 15 мг/л. Орошение растений при выращивании с закрытой корневой системой может быть капельным, способом дождевания, подачей воды по поверхности стеллажа, каждый способ имеет преимущества и недостатки.

При наличии в компонентах субстрата патогенных организмов их подвергают стерилизации, либо теплом, либо с использованием химических препаратов. Температура тепловой обработки 88 °С. Перед тепловой стерилизацией необходимо довести значение pH до 6, такая кислотность уменьшает высвобождение марганца, который может достигнуть токсичного уровня.

Перед посадкой субстрат должен быть увлажнен. Оптимальный размер диаметра контейнера составляет 20–25 см, высота – 30 см. Контейнеры заполняются субстратом на половину, затем помещаются привитые растения и заполняется оставшийся объем субстратом. Для лучшего использования воды при орошении оставляют 2–2,5 см от кромки контейнера не засыпанными. Ежедневно необходимы жидкие подкормки азотнокислым аммонием из расчета 125 мг/л. Хорошие результаты получены при внесении в контейнеры комплексных удобрений пролонгированного дейст-

вия, их преимуществом является наличие индукционного периода, в течение которого они насыщаются влагой и не выделяют элементов питания, хорошее согласование с биологией растения и их минимальной потребностью в питании в начальный период после посадки. Закаливание растений, выращенных в теплице обязательно, оно предусматривает интенсивное проветривание и снятие пленки через 3–5 месяцев после посадки прививок.

1.4. Возможные сочетания полей питомника

О развитии той или иной отрасли сельского хозяйства можно судить по тому, как поставлено воспроизводство, будь то в животноводстве, растениеводстве или же в садоводстве. Развитие в стране питомниководства прямо коррелирует с развитием садоводства. Для обеспечения населения страны фруктами хотя бы на уровне 80 кг в год на душу населения, питомниководы должны ежегодно производить около 40 млн саженцев косточковых и 30 млн семечковых. При этом большая часть саженцев должна быть выращена на клоновых подвоях. Питомник – это самостоятельная отрасль садоводства, она должна ориентироваться на выпуск большого числа пород и сортов растений. Оптимальным размером промышленного питомника является от 50 до 200 га, такая площадь позволяет эффективно управлять питомником и в полной мере соблюдать севообороты. Выращивание привитого посадочного материала очень консервативная отрасль. Питомник относится к отрасли сельского хозяйства с высокой степенью почвоутомления. Его структура, способы прививки насчитывают сотни и даже тысячи лет. Одним из критериев эффективности работы плодового питомника является выход саженцев в третьем поле, который колеблется от 25 до 50 тыс./га. Однако, если учитывать все участки питомника, участвующие в процессе размножения, то в этом случае выход составит 6–15 тыс./га, а с учетом полей севооборота 2–5 тыс./га. Кроме того, чем больше разнооб-

разных площадей занято при выращивании продукции, тем сложнее его механизировать процесс.

Создание привитого посадочного материала, является по сути хирургической операцией, а поэтому она на порядок сложнее, по сравнению с другими агротехническими приемами. Первые попытки уменьшить количество полей в питомнике, были предприняты в 30-х и 50-х годах прошлого века в России. Однако сочетание маточника вертикальных отводков клоновых подвоев с первым полем питомника не нашло практического применения из-за трудности проведения окулировки, невозможности контролировать развитие на отводках корневой системы. Со временем было показано перспективность высокой окулировки, которая облегчала эту операцию в маточнике вертикальных отводков.

Учитывая, что количество отводков в маточнике, пригодных для окулировки на высоте 40 см не превышает 2–3 шт., разработана технология плотной посадки маточника и двойное мульчирование. Нормировка побегов обеспечивала необходимое развитие отводков для окулировки на высоте 40 см, не усложняла сам процесс окулировки. Оптимальным следует признать 3–4 побега на маточный куст. Двойное мульчирование (пленка + субстрат) способствовало более интенсивному росту отводков и их укоренению, по сравнению с контролем. В условиях средней полосы России глазки, заокулированные на высоте 40 см, попадают в наиболее морозобойную зону, что приводит к их гибели зимой. Принимая во внимание такую возможность, заокулированные отводки отделяли осенью, весной высаживали в открытый грунт, или в контейнеры в подтапливаемую питательным раствором рассадную теплицу, в теплицу для малообъемного выращивания овощей. Приживаемость заокулированных отводков в открытом грунте составила 65 %, рост окулянтов не превышал 10–15 см.

Развитие саженцев в теплице зависело от степени укоренения отводков, максимальное количество корней у однолетних саженцев

(56,7 шт.) отмечено в варианте с выращиванием отводков в контейнере, минимальное (3 шт.) – при локальной этиоляции отводков, при этом высота однолетних саженцев соответствовала стандарту. Заслуживает внимания один вариант прививки подвоев в маточнике в июне месяце черенком на высоте 40 см с последующей полной обвязкой черенка пленкой. Осенью отводки отделялись, хранились при температуре +4 °С, весной высаживались в контейнеры, к концу июня они достигали размеров стандартной однолетки.

В условиях подтапливаемой рассадной теплицы 60 % саженцев развили боковые побеги. При этом боковые побеги развивались непосредственно из заокулированной почки. К середине сентября их длина была равна 34,4 см, наиболее интенсивно саженцы росли при посадке заокулированных отводков в теплицу с малообъемным выращиванием овощей. За 6 месяцев вегетации высота привойной части саженца достигала двух метров, при этом большая часть почек развивалась в кольчатки.

Сочетание маточника клоновых подвоев и первого поля питомника возможно при условии выращивания маточника по типу горизонтальных отводков в пленочной теплице. Двухстрочная посадка хорошо развитых отводков позволяет получать на одном участке 100–150 тыс./га стандартных однолетних, разветвленных саженцев и примерно такое же количество отводков для повторного использования. Уменьшить количество полей питомника возможно при сочетании горизонтального маточно-черенкового сада с первым полем питомника, т.е. подвой прививается на вертикально растущий привой. Для этого в мае–июне однолетние ветки маточно-черенкового сада необходимо привить подвоем, перед прививкой ветки кронируются. Выход двухлетних саженцев может составить 110–150 тыс./га.

К недостаткам данной технологии следует отнести большие затраты ручного труда на выкопку саженцев. П.Г. Шитт в начале 20-х годов прошлого века доказал возможность использовать в

качестве маточно-черенкового сада побеги заготовленные в питомнике. Полученные привитые деревья не отличались по времени вступления в плодоношение, ни урожайностью. Единственный минус данной технологии – возможные ошибки сортового соответствия. Однако эта проблема может быть решена, если в первое поле питомника высаживать клоновые подвои двухстрочно. Один ряд окулируется в обычные сроки по общепринятой технологии, а во втором ряду в первый год заготавливают зеленые черенки. При кронировании однолеток, черенки используются для весенней прививки во втором ряду на высоте 40 см, осенью производят выкопку двухлетних саженцев с обоих рядов.

Использование слаборослых подвоев позволило изменить способ закладки сада. Так как расстояние в ряду сократилось до 0,8–1 м то подвои можно высаживать непосредственно на место будущего сада и там производить окулировку. Однако следует отметить, что производительность прививки будет значительно меньше, чем в питомнике.

Современный сад – это сад, прежде всего низкорослых деревьев, их можно создать различными способами на сильнорослом подвое. Высота плодового дерева зависит, во-первых, от высоты штамба, во-вторых, от количества вертикально растущих проводников. Поэтому, если уменьшить высоту штамба и увеличить количество проводников, высота дерева снизится. Для этого двухлетние семенные подвои высаживают в будущий сад на расстоянии 0,8 м, весной подвоям придают горизонтальное положение на высоте 25 см от земли, при этом все побеги, которые направлены вниз, удаляют, окулировку при этом проводят в обычные сроки. Таким образом, на одном погонном метре горизонтально растущего ствола развивается семь окулянтов. В первый год своего развития они достигают высоты 90 см, разница в длине при этом равна 10–15 см, на некоторых окулянтах развиваются боковые побеги, типа кольчатки, которые на следующий год не цвели.

Глава 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ КОРНЕСОБСТВЕННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА

2.1. Размножение садовых растений зелеными черенками

Технологии получения корнесобственных растений привлекают, прежде всего, упрощённой технологией выращивания саженцев. Активные и многочисленные исследования в этом направлении позволили создать относительно полную картину адвентивного формирования корней у черенков. Хотя технические решения были найдены давно. В XVI в. афганские крестьяне сажали черенки маслины в проросший ячмень, что стимулировало у них корнеобразование. В XIX в. отмечено положительное влияние проведения нижнего среза черенка через почку и обработку его смесью воды, клея и угольной пыли. В это же время было установлена зависимость укоренения черенков от времени заготовки и условий, в которых происходит укоренение.

Однако такие эмпирические опыты не могли выявить механизмы корнеобразования, а не зная их, невозможно целенаправленно им управлять. Первые анатомические исследования показали аналогичность образование корней у ивы и яблони. Было отмечено, что в местах следов опавших листьев имеются выходы сосудисто-проводящих пучков и образование корней происходит преимущественно в этом месте. Для того чтобы произошло укоренение, необходимо прохождение полного цикла клеточных превращений специализированных стеблевых клеток в меристематические клетки, а затем в специализированные клетки корня. Поэтому процесс корнеобразования следует рассматривать как последовательную серию биохимических, физиологических и гистологических событий.

В конце XIX в. проведенные анатомические исследования показали, что адвентивные корни могут начать развитие в любой ткани, но обязательно около камбия, также формирование корней возможно из каллуса, который развивается на базальной части черенка.

Однако и в этом случае в каллусе должен развиваться камбий. Корни, которые развились из внутренних тканей черенка, называются эндогенными, а из внешних экзогенными. Было показано, что экзогенные корни препятствуют развитию эндогенных корней (рис. 5).



Рис. 5. Укорененные зеленые черенки крыжовника

Вначале предполагали, что заложение корней около сосудисто-проводящей системы связано с питанием. Однако позднее были представлены доказательства о влиянии гормонального фактора. Сосудисто-проводящая система адвентивного корня начинает формироваться по мере продвижения корня к внешним тканям черенка и через определенное время она соединяется с его проводящей системой. К моменту выхода адвентивного корня за пределы черенка у него формируется корневой чехлик. Таким образом, весь цикл развития адвентивных корней можно разделить на три этапа.

1. Индукция – продолжительность этого этапа 1–6 дней от момента срезки черенка и началом клеточного деления.

2. Инициация – продолжительность этого этапа 6–9 дней, за это время происходит дифференциация и развитие корневых примордиев.

3. Появление адвентивных корней за пределами черенка, продолжительность этапа 9 и более дней.

Процесс корнеобразования может быть прямым и непрямым. В первом случае в тканях черенка существуют компетентные клетки, которые после отделения черенков начинают развиваться как корневые примордии. Во втором случае необходимо создать

условия для их образования. В компетентных клетках происходит формирование корнеспецифических белков, которые соединяются с ауксином, что и приводит к формированию корней. Прямой или не прямой путь развития адвентивных корней зависит от генотипа растения, его возраста, условий выращивания маточного растения.

Промышленное выращивание корнесобственных растений стало возможным после открытия ауксина, синтеза его аналогов и создания установок искусственного тумана. Ауксин один из основных факторов в регенерации корней у черенков. В первые 24 ч клетки расположенные между сосудисто-проводящими пучками аккумулируют крахмал и становятся компетентными для воздействия ауксина. В течение следующих 96 ч клетки делятся, крахмал разрушается, образуются меристематиды, состоящие из 30 клеток, которые затем развиваются в корни. Ауксин необходим на начальном этапе, а дальнейшее его присутствие ингибирует развитие корней, при этом продукты распада ауксина стимулируют прохождение следующих этапов корнеобразования. Ауксины вырабатываются самими растениями, но большинство видов растений требуют обработки черенков экзогенными ауксинами, в связи с этим возникает вопрос, какой ауксин играет ключевую роль в корнеобразовании.

Местом синтеза ауксина в растении являются молодые листья и почки, их удаление препятствует укоренению, а обработка основания черенка экзогенным ауксином лишь частично компенсирует отсутствие эндогенного ауксина. Первичное взаимодействие эндогенного ауксина с клеткой служит мембранный белок. Показано, что экзогенный ауксин может увеличить количество этого белка или уменьшить в зависимости от типа ауксина и его концентрации. Согласно работам Скуга и Миллера формирование корней определяется соотношением ауксина и цитокинина. Их содержание в зоне укоренения в процессе образования корней изменяется. В течение 24 ч после черенкования уровень цитокининов резко уменьшается и сохраняется на низком уровне 3–4 дня.

Под их влиянием происходит клеточное деление, приводящее к формированию меристематидов.

Опыты, проведенные *in vitro*, показали, что вещества со слабой цитокининовой активностью NN бис (2,3-метилendioксифенил) мочевины способствуют клеточному делению, образованию меристематидов и развитию корней, соединения из этой химической группы могут прямо участвовать с ауксином, повышая укоренение. В момент растяжения корневых зачатков, т.е. на 5–6-й день уровень цитокининов повышается. Поэтому после обработки черенков ИМК применение цитокининов в момент нарезки черенков ингибирует ризогенез, через 24 ч не влияет, через 43 ч стимулирует корнеобразование. Активность эндогенного ауксина в первые 24 ч очень высокая, а затем резко падает, с его разложением до индолилацетата аспарагеновой кислоты.

С открытием этилена было сделано предположение о его участии в процессе корнеобразования. При этом он играл как положительную, так и отрицательную роль. Обработка этиленом в момент заложения корней ингибировала их заложение, но стимулировала развитие уже заложенных корней. После нарезки черенков максимум синтеза этилена тканями черенка происходит через 10–12 ч, а затем постепенно уменьшается. Положительное взаимодействие ауксина и этилена в процессе корнеобразования происходит в том случае, когда высокие дозы ауксина сопровождаются низкой скоростью синтеза этилена. Можно сказать, что ауксин и этилен являются антагонистами в данном процессе. Возникает определенное противоречие – ауксин стимулирует корнеобразование, но одновременно он повышает уровень этилена, который препятствует заложению корней. Поэтому желательно разделить во времени заложение первого примордия корня с началом синтеза этилена.

Модельные опыты с этиленом показали, что этилен, как гормон старения, уменьшает механическую прочность коры и древесины, облегчая тем самым прохождение адвентивных корней.

Однако влияние этилена на процесс корнеобразование не сводится только к этому, так как его удаление в зоне корнеобразования полностью ингибировало укоренение. Нужно учитывать, что этилен влияет на транспорт ауксина. Применение различных веществ, которые подавляли синтез этилена, давали часто противоположные результаты в вопросе укоренения черенков. Известный прием замачивания одревесневших черенков в воде связан, в том числе, с увеличением синтеза этилена, как и их прогревание. Применение гиббереллина в последнюю фазу образования корней ингибирует этот процесс. Это связано с тем, что гиббереллин способствует увеличению концентрации ИУК, благодаря блокированию синтеза ферментов, разрушающих ауксин.

Особая роль отводится кофакторам укоренения. Они не участвуют непосредственно в укоренении, но их присутствие необходимо. К ним относятся полиамины, особенно спермин, дикарбоновые кислоты (аспарагеновая, глутаминовая), амиды (аспарогин, глутамин), основные аминокислоты (лизин, аргинин) и антиоксиданты, которые защищают природные гормоны от окисления.

Важная роль отводится также цинку и бору. Первый влияет на сохранность в тканях ИУК, а второй участвует в превращении триптофана в ИУК, а не в белок.

Большую роль в укоренении черенков играет возраст маточного растения. Во время жизненного цикла древесных растений наблюдается постепенный переход от ювенильной стадии развития к взрослой. Ювенильная фаза развития характеризуется легкостью заложения корней, черенки, взятые с растений в этой стадии, способны к прямому корнеобразованию (т.е. они обладают компетентными клетками). Клеточное деление у ювенильных черенков происходит во флоэме, а у взрослых в ксилеме. При этом делящиеся клетки черенков в ювенильной стадии развития сосредоточены компактно, а у взрослых разбросаны. Черенки, полученные от ювенильных растений, лучше реагируют на экзогенный

ауксин, и уже на 9 день имеют хорошо сформировавшиеся корневые зачатки, а у черенков от взрослых растений отмечено лишь беспорядочное деление клеток. К 12-му дню корневые зачатки черенков в ювенильной стадии развития имеют хорошую анатомическую связь с сосудисто-проводящей системой черенка, в то же время у черенков со взрослых растений такая связь отсутствует. Таким образом, взросление растений сопровождается снижением, а иногда полной потерей способности к образованию придаточных корней.

Исследования в этом направлении показали, что гены ответственные за формирование адвентивных корней с возрастом не вовлекаются в молекулярный процесс адвентивного корнеобразования. Возвращение в ювенильную фазу маточных растений возможно с помощью сильной омолаживающей обрезки, размножением в культуре ткани, корневыми черенками. Одна из причин лучшей укореняемости у стадийно ювенильных черенков, более ранняя камбиальная активность. Однако не всегда ювенилизация повышает укореняемость. У персика черенки со взрослых растений укоренялись в два раза лучше.

Развитие корневой системы растения происходит в почве, т.е. в отсутствии света. Положительный эффект этиоляции, который ярко проявляется на отводочных маточниках, и используется и при зеленом черенковании. Одна из причин, почему свет ингибирует образование корней на свету – низкая активность ферментов разрушающих ауксин. При этом укоренение таких черенков стимулировалось неочищенными продуктами окисления ИУК и пара-кумаровой кислотой.

Разработаны два типа этиоляции – общая и локальная этиоляция. Общая этиоляция предусматривает накрытие весной обрезанных маточных растений черной пленкой. В таких условиях побеги достигают длины 15–20 см, после чего маточник раскрывают, побеги приобретают зеленую окраску, используются как зеленые черен-

ки. При локальной этиоляции от света закрывается только основание побега. Причины влияния этиоляции на укоренение до конца не выяснены, но точно установлено, что этиоляция изменяет анатомические и биохимические процессы. Она сокращает толщину клеточных стенок и кутикулу почти в два раза. Это способствует повышению реакции тканей на экзогенный ауксин. Транспорт ауксина не блокируется в зоне этиоляции, но в течение 7 дней после нарезки черенков его содержание уменьшается значительно. Частичное, или полное устранение света уменьшает содержание углеводов во внешних тканях, а во внутренних только фруктозы. У этиолированных черенков выделены белки рецепторы, обладающие высоким родством с ауксином. Все эти изменения приводят к тому, что у них наблюдается начало заложения корней через 20–24 ч а появление через 70 ч, у не этиолированных соответственно через 50 и 100 ч.

Для некоторых культур зеленое черенкование по сей день является серьезной проблемой, особенно для орехоплодных. Укореняемость черенков грецкого ореха не превышает 5%. Максимальное укоренение грецкого ореха (72%) было получено от локальной этиоляции побегов и их дефолиации при достижении 30 см. Для фундука лучшим вариантом была локальная этиоляция липкой лентой с нанесением кристаллов ИМК без последующей дефолиации. Многие культуры укореняются лучше после двойной этиоляции, т.е. общей, а затем локальной. Только локальная этиоляция требует дополнительной обработки ауксином.

Процесс корнеобразования у черенков зависит от света, температуры и влажности. Эти физические факторы имеют огромное практическое значение, так как процесс ризогенеза основывается на их регулировании. Заложение и развитие корней процесс энергозатратный, а поэтому черенки должны иметь достаточное количество углеводов, которые переносятся к основанию черенка, где участвуют в ризогенезе. Вместе с углеводами в зону будущих корней переносится и эндогенный ауксин.

В первые пять дней после нарезки черенков интенсивность фотосинтеза листьев черенков равна интенсивности маточного растения, а затем резко падает. Условия освещения маточных растений может влиять, в определенной степени, на образовании корней, как с точки зрения наличия углеводов, так и способностью поглощать экзогенный ауксин. Все эти параметры черенка зависят от нахождения побегов на маточном растении, а следовательно, могут влиять на их укоренение (рис. 6).



Рис. 6. Укоренение зеленых черенков в теплице с ТОУ

Однако при массовой заготовке черенков трудно принимать во внимание их зональное положение. В определенной степени уменьшить разнокачественность черенков можно, если маточные растения формировать по типу живой изгороди. Для этого маточные растения срезаются на высоте 50 см, весной следующего года образовавшиеся побеги укорачивают на 3–4 почки, терминальным побегам придают горизонтальное положение. Зеленые черенки такого маточника относительно однородны, а поэтому их реакция на различные факторы будут одинаковыми. Такой маточник хорошо себя зарекомендовал при использовании одревесневших черенков.

Длина дня фактор очень важный для получения корнесобственных растений, определяющий срок начала черенкования. От

этого фактора зависит процент укоренения, способность черенков возобновлять рост в год черенкования, приживаемость укорененных черенков при пересадке. В год, когда весеннее развитие маточных растений замедлено и черенкование сдвигается на более поздние сроки, то даже если нарезать черенки оптимальной длины, укореняемость снижается, а их рост не возобновляется. В благоприятные годы, когда черенкование можно начать раньше, укореняемость повышается, а новый прирост у вишни и сливы может достигать 40–50 см. Поэтому, чем хуже укореняемость культуры, тем длительней черенки должны находиться при длинном дне. Продлить такие условия, можно выгонкой побегов в теплице в условиях защищенного грунта. Однако при раннем черенковании, особенно когда процесс одревеснения только начинается, особое значение имеют приемы, снижающие опасность загнивания черенков. К ним следует отнести использование комбинированных черенков, обеззараживание субстрата и улучшение его фильтрующих свойств.

Большой процент гибели укоренённых черенков при зимнем хранении является серьезной проблемой для питомниководства, причина в низком содержании углеводов в тканях растений, особенно в корнях. Черенки, которые трогаются в рост, пополняют запасы углеводов возобновляя фотосинтез.

Укоренение черенков складывается из следующих друг за другом процессов, требующих различных температур. Для того чтобы прошел процесс индукции, необходимо чтобы эндогенный ауксин попал в клетку. Для этого он должен соединиться с белком рецептором. Максимальное соединение происходит при температуре +25 °С. Поэтому в первую фазу корнеобразования температура субстрата должна быть в пределах 20–25 °С, и на 2–6 °С выше температуры воздуха, что будет способствовать перемещению углеводов, а вместе с ними эндогенного ауксина к компетентным клетки. Коэффициент корреляции между температурой субстрата и укореняемостью черенков равен 0,69, что говорит о сильной линейной связи.

Наглядный пример влияния температуры субстрата на укореняемость можно привести в опытах с персиком. При температуре субстрата +24 °С, корни образовывались на 18-й день, при +20 °С на 25-й день, при +15 °С на 40-й день, при +8–10 °С отмечена гибель черенков. По мере перехода черенка к автотрофному питанию, когда сформировавшиеся корни способны поглощать питательные вещества, более благоприятно превышение температуры воздуха.

После отделения черенков от маточного растения листья продолжают транспирировать. Чтобы сохранить черенки живыми, необходимо сократить транспирацию до минимума. Для этого давление водяных паров, окружающих листья и давление внутри листа необходимо уравнивать. Данная проблема решается с помощью искусственного тумана, кроме того пленка, образующая на поверхности листа снижает его температуру и дыхание. Однако кроме положительных качеств, искусственный туман создает избыточную влажность субстрата, вследствие необходимого частого включения и больших размеров капель. Можно уменьшить диаметр сопла форсунки, повысить давление в системе, использовать фильтры, однако это усложняет систему, что всегда сказывается на ее надежности. В связи с этим была разработана система «ФОГ», которая поддерживает влажность воздуха около 100 %, а влажность субстрата 50–60 %. Она позволяет получать капли тумана размером 1–5 микрон, расход воды в теплице объемом 150 м³ до 0,8–2 л в день, в таких условиях укореняемость черенков подвоя М9 достигала 80–90 %, в обычном тумане 35 %.

Более простой способ создания необходимой влажности воздуха и субстрата для укоренения черенков в традиционном тумане, в тоннелях, покрытых тонким нетканым материалом. Вся система должна находиться в пленочной теплице, а туман должен работать над тоннелем.

Повысить укоренение черенков можно, воздействуя на маточные растения до заготовки черенков, манипулируя условиями

во время обработки ауксином, делая поранение основания черенка, использованием надлежащего субстрата, который обеспечивает оптимальную влажность (50–60 %) и содержание кислорода 15–20 %. Высокий процент укоренения еще не гарантирует экономический успех, так как значительная часть после укоренения может погибнуть. Особенно часто это наблюдается при укоренении персика, Ежедневное опрыскивание черенков после начала укоренения БАП в сочетании с НУК или мезоинозитом увеличивало число выживших на 35 %.

2.2. Размножение садовых растений одревесневшими черенками

Размножение садовых растений одревесневшими черенками, особенно клоновых подвоев, считается наиболее простым и эффективным способом, так как если удастся их укоренить, то к концу вегетации они достигают размеров однолетних саженцев.

Условия укоренения не такие строгие, как при зеленом черенковании. Ряд операций можно автоматизировать и механизировать. В перспективе возможна зимняя прививка черенка привоя на черенок подвоя и получение саженца. Опыты, проведенные в Италии со сливой, яблоней и грушей показали на возможность такой технологии. Положительные результаты были получены только при прививке груши на айву. Наиболее простой способ размножения клоновых подвоев одревесневшими черенками – использование неокоренных отводков. Их заготавливают осенью во время отделения отводков. Черенки нарезают из нижней части длиной 18–25 см, хранят в ящиках в вертикальном положении, засыпанными песком. Температура хранения 0–3 °С. При появлении зачатков корней, весной черенки высаживают в пленочные теплицы.

Учитывая, что некоторые подвои размножаются отводками плохо, маточные растения высаживают плотно (90 × 90 см), основания маточных растений засыпают субстратом за 2–2,5 месяца

до заготовки черенков, чтобы вызвать этиоляцию. С таких маточников можно заготовить около 300 тыс. черенков с гектара, которые в условиях теплицы укореняются на 50–70 %. Однако черенки некоторых культур, например пекана, даже при такой технологии не способны к укоренению. Поэтому, воздействуя на побеги до заготовки черенков, а именно поранением основания побега, обработкой поранения ланолиновой пастой, содержащей 3000 мг/л ИМК, давало 100 % укоренение черенков. Размножение клоновых подвоев особенно перспективно для сливы, так как подвои этой культуры в вертикальном маточнике часто перерастают, что затрудняет их окулировку. Опыты, проведенные в Белоруссии, показали на перспективность такого размножения. Черенки заготавливают осенью, обрабатывают ИМК, стратифицируют до образования каллуса и высаживают в поле под зиму. Приживаемость черенков составляет 30–50 %. Для увеличения приживаемости авторы рекомендуют высаживать черенки по мульчирующей пленке. Такая методика позволила увеличить укоренение подвоев ОД-2-3, 140-1, 140-2, 146-2, ВВА-1 в 2–2,5 раза. Однако представленные технологии ориентированы не на истинные черенки, а своего рода на полуфабрикат.

Истинные одревесневшие черенки, это черенки, заготовленные с маточных растений, сформированные по типу живая изгородь. Долгое время такие черенки применялись в размножении только культур, отличающихся хорошим укоренением, особенно тех, которые способны предварительно формировать компетентные клетки в побегах во время вегетационного периода. Корнеобразование у одревесневших черенков зависит от среднесуточной температуры, количества полученных холодных единиц, времени опадения листьев, способности к пробуждению почек, содержания в них воды и фенолов, активности пероксидазы и полифенол оксидазы. Средняя дневная температура вегетационного периода и воздействие низких положительных (холодовых единиц)

вливают на все перечисленные параметры, запуская разнообразные сложные биохимические, физиологические процессы, которые приводят к укоренению, или к не укоренению.

Время заготовки черенков связывают с началом листопада у маточных растений. Чтобы его определить, необходимо осенью провести рукой по стеблю, если листья при этом легко опадают, то это будет время заготовки черенков. Оптимальное время заготовки для разных культур будет различным. Одревесневшие черенки подвоя М26, заготовленные поздно осенью укоренялись на 40–60 %, в ноябре–феврале на 0–20 %, с середины и до конца зимы на 70–100 %. Укоренение черенков подвоев для сливы было максимальным, если их заготавливали в октябре. Максимальное укоренение черенков для различных культур, положительно коррелировало с содержанием полифенол оксидазы, и оводненностью их свыше 50 %. В это время почки различных культур находятся в органическом покое, содержание воды и фенолов оптимально для укоренения. Проведенные опыты показали, что для рано распускающихся весной культур, черенки лучше заготавливать осенью, для культур, которые начинают вегетацию поздно весной – лучше рано весной. Длина черенка должна быть не менее 25 см, но более длинные черенки увеличивают процент укоренения, кроме того они за один год они развиваются в стандартную однолетку. Толщина черенка не менее толщины карандаша. Срезы черенков делают, как можно ближе к основанию побега. Срезка черенков на высоте 0, 10, 20, 30 см от основания побега дало 80, 60, 40, 0 % укоренения. Для лучшего поглощения ауксина, срез должен быть перпендикулярный побегу.

Обработка черенков регуляторами роста имеет принципиальное значение, так как их камбиальная активность гораздо слабее, по сравнению с зелёными черенками. Как правило, основание черенков обрабатывают 50 % концентрированным спиртовым раствором ИМК, погружая основание черенка 2–5 мм на 3–5 с. После

обработки ауксином, черенки выдерживают 30 мин при комнатной температуре. Концентрация ИМК зависит от культуры и колеблется от 1000 до 5000 мг/л. Следует учитывать, что условия окружающей среды, при которой развивались побеги, а также условия при обработке влияют на концентрацию ИМК и продолжительность операции. Укореняемость подвоя ММ106 была выше, если использовали методику обработки зеленых черенков, т.е. ИМК применяли в виде водного раствора, его концентрация равнялась 50–250 мг/л, а продолжительность 24 ч. Более того, если предварительно черенки данного подвоя замачивали в воде, то концентрация ИМК была наименьшей.

Для некоторых культур обработку черенков ИМК проводят в виде пудры, при такой методике основания черенков замачивают в растворе ацетона или спирта. Большой процент укоренения одревесневших черенков подвоя «Весеннее пламя» был получен при замачивании их в растворе жидкого гумуса, а черенков подвоев ВВА-1 и ВСЛ-1 в растворе сахарозы с гумусом. Выбор способа обработки зависит от культуры. Например, одревесневшие черенки персика лучше реагировали на обработку 0,1 % раствора ИМК, чем на обработку пудрой.

Особая роль в укоренении одревесневших черенков отводится почкам. Необходимо создать условия, при которых индукция корнеобразования произошла до начала их распускания. Очень важно чтобы ко времени выхода почек из состояния покоя черенки имели относительно развитые корни. Поэтому для стимулирования индукции корнеобразования основание черенка подвергается воздействию высоких температур. Такое воздействие особенно важно, если заготовка черенков задерживается до ранней весны. Оптимальной, считается температура +18–21 °С, продолжительность воздействия 2–4 недели, хотя корнеобразование увеличивается с увеличением продолжительности воздействия, но приживаемость черенков в поле резко сокращается, в свя-

зи с уменьшением содержания в них углеводов. Для некоторых культур и сортов требуется переменное воздействие повышенной температуры. Укоренение повышалось, если черенки прогревались 3 дня при температуре +25 °С, а затем температуру уменьшали на +2 °С каждый день до температуры окружающего воздуха. Для некоторых подвоев (М26) целесообразно черенки поместить в полиэтиленовый пакет, подвергнуть воздействию +35 °С в течение 18 ч, а затем обработать ИМК. Увеличение укореняемости от такой обработки связано с увеличением в 30–40 раз этилена в пакетах по сравнению с температурой +10 °С. Существует определенная связь между температурой прогревания и концентрацией ауксина, с увеличением температуры от +21 до +25 °С концентрацию ИМК необходимо уменьшить в два раза.

Предполагают, что реакция на температурное воздействие связано с началом роста весной. Культуры, которые начинают вегетацию раньше нуждаются в более низком уровне воздействия температура/продолжительность. Хорошим компостом для прогревания черенков является сфагновый торф и песок в соотношении 1:1, переувлажнение субстрата не допустимо. Оптимальное соотношение воздуха и воды в субстрате было получено при использовании гранулированной коры хвойных, либо при использовании в качестве субстрата цеолита в смеси с торфом и песком. Более сложная система, но обеспечивающая максимальный процент укоренения – подача кислорода в зону корнеобразования. Она улучшала аэрацию черенков, так как повышенная температура и обработка их ИМК способствует развитию анаэробного дыхания и аккумулярованию этанола в тканях. Прогревание черенков необходимо проводить в холодном помещении, что увеличивает содержание в них углеводов на момент пересадки в поле. Имеется много сообщений о положительном влиянии на укоренение поранение оснований черенка перед обработкой ИМК и прогреванием.

Таким образом, есть факторы, которые влияют положительно или отрицательно на корнеобразование одревесневших черенков.

1. Развитие каллуса не обязательно свидетельствует о хорошем образовании корней. Каллусообразование и развитие корней – это два самостоятельных процесса, не находящихся друг с другом в последовательной зависимости. Характер связи между образованием каллуса и развитие эндогенных корней зависит от внешних условия. Первому благоприятствует высокое содержание в почве (субстрате) воды, второму – низкое содержание воды при достаточной аэрации.

2. Химические вещества и способ их применения могут направить процесс на каллусообразование, либо корнеобразование. Для некоторых культур совместное применение ИМК и НУК стимулирует образование корней.

3. Чем больше в черенке питательных веществ, тем больше вероятность их укоренения. Очень важно, в какой форме присутствуют углеводы. Показано, что фруктоза предпочтительней для образования корней.

4. В процессе прогревания черенков они не должны быть связаны в пучки. Основание черенка должно быть выше нагревательных элементов на 2,5–5 см. Режим прогревания зависит от состояния покоя. В ноябре температура прогревания может быть выше, а в марте ниже.

5. Как правило, чем моложе ветка, на которой развился побег, тем лучше укореняются одревесневшие черенки. Эта закономерность отмечена для яблони, груши, антипки, дикой черешни, сливы.

6. Локальная этиоляция побегов, во время их роста на маточном дереве, стимулирует укоренение одревесневших черенков.

7. Не всегда совпадает способность культуры размножаться вертикальными отводками с образованием корней у одревесневших черенков. Вертикальные отводки подвоя сливы Мариана плохо укореняются в маточнике, а одревесневшими черенками часто на 100 %.

2.3. Теоретические предпосылки получения разветвленных однолетних саженцев

В настоящее время при закладке сада предпочтение отдается однолетним разветвленным саженцам. С увеличением количества боковых побегов увеличивается урожайность плодового дерева. Количество боковых пробегов – сортовая особенность, она связана с пробудимостью почек и побегообразовательной способностью сорта. Однако эти характеристики могут быть модифицированы подвоем, химической обработкой растений в питомнике, механическими воздействиями. В основе развития боковых побегов лежит апикальное доминирование. Вначале было сделано предположение, что лимитированное снабжение боковых почек питанием, водой не способствует развитию почек в побеги. Действительно трудно заставить однолетний саженец ветвиться при недостатке, например азота и при загущенной посадке. Однако основную роль в данном вопросе играют гормоны.

В 1936 г. Вент впервые предложил, что ауксин является основным фактором апикального доминирования. Его содержание особенно высокое в верхушке побега, размещение ауксина на месте удаленной верхушки препятствует пробуждению к росту боковых почек. Вместе с тем, если ауксин применяли после роста боковых почек, то это стимулировала их рост. С открытием цитокинина и его применения на растении, было отмечено, что он освобождает боковые почки от апикального доминирования, но для продолжительного их роста необходима обработка ауксином, либо гиббереллином.

Удаление молодых листьев верхушки также стимулирует пробуждение боковых почек, что связано с удалением источника ауксина. Дальнейшие исследования показали, что ингибирование пробуждения верхних боковых почек связано с синтезом ауксина, а нижних с синтезом в старых листьях АБК. Поэтому не однозначна реакция верхних и нижних почек на то или иное воздейст-

вие, обработку различными регуляторами роста. В естественных условиях у однолетних саженцев, хорошо ветвящихся сортов, боковые почки прорастают в середине окулянта, что связано с возрастом листа и почки. Таким образом, на основании физиологических опытов, можно сказать, что ауксин играет основную роль в апикальном доминировании, а цитокинины, в той или иной степени, освобождают почки от этого физиологического феномена.

Учитывая, что цитокинин синтезируется в корнях, было показано влияние различных, по силе роста подвоев, на степень ветвления сорта. Сорта на сильнорослом подвое продуцируют больше и длиннее боковые побеги, чем на карликовых подвоях. Биохимические анализы подтвердили такое влияние. Верхушки сорта на подвое М27 содержали в июне в три раза больше ауксина, чем на подвое ММ106.

На знании механизмов апикального доминирования в Голландии разработана технология получения разветвлённых саженцев, названная knit boom. Суть данной технологии заключается в том, что двухлетние или однолетние саженцы срезаются на высоте будущего штамба. Наличие мощной корневой системы с ее синтезом цитокининов стимулирует пробуждение боковых почек. Интенсивный рост надземной системы вырабатывает достаточное количество ауксина, что стимулирует рост боковых побегов.

После того как были проведены физиологические исследования и стало понятным участие гормонов в апикальном доминировании, химики синтезировали регуляторы роста, которые позволяют получать разветвленные однолетние саженцы. К ним следует отнести препарат Промалин, который состоит из 6-БАП + ГК4 + ГК7 по 1,8 % каждого, аналог Промалина – Патурил. Оба препарата местного действия, т.е. они не перемещаются по растению. Поэтому их применяют на те части растения, где желателно образование боковых побегов. Промалин применяют при высоте окулянта 50–60 см, опрыскивая верхнюю часть длиной 15–20 см.

Концентрация его зависит от степени ветвления сорта: для хорошо ветвящихся сортов его применяют в дозе 12,5 мг/л, средне ветвящихся – 25 мг/л, плохо ветвящихся – 37,5 мг/л.

Ветвление саженцев можно повысить, удаляя листья верхушки + применяя опрыскивание 0,002 % эпином экстра + 0,5 % растворином + 0,7–0,9%-й мочевиной. Были попытки использовать в качестве регулятора роста ТИБК, которая, блокируя перемещение ауксина, стимулирует их ветвление. Однако это вещество вызывает фасциацию побегов. Некоторые вещества, например жирные кислоты, обладают селективным действием, временно устраняя влияние верхушки, но достаточное, чтобы боковые почки начали прорастать. После начала синтеза верхушкой ауксина почки образуют боковые побеги. Однако действие этих кислот очень непостоянно. Поэтому были синтезированы соединения, которые работая по этому принципу, дают стабильные результаты. К ним следует отнести М/В-25105, НС-9634, РР-528. Принцип их действия заключается в том, что они сокращают уровень ауксина в верхушке на период около двух недель иногда в 8 раз. Количество боковых побегов при этом увеличивается в 2–5 раз в зависимости от сорта.

Идеальное плодовое дерево характеризуется не только наличием достаточного количества боковых побегов, но и их правильным расположением. Нижние побеги при формировке саженцев в питомнике нужно удалять, так как они мешают применению в саду гербицидов, а плоды на них поражаются патогенами. Для этого проводят такую операцию, как подчистка штамбика, такое удаление стимулирует к росту вышерасположенные побеги, однако этот технологический прием рассчитан на ручной труд. Потребовалось подобрать такие вещества, которые задерживали рост побегов в зоне штамба, но медленно перемещались по растению. Из всей гаммы испытанных веществ таким свойством обладал ретардант Амех-820. Лучшим вариантом была следующая очередность

применения регуляторов роста. Вначале обрабатывают штамб Амех-820, а через 24 ч применяют РР-328, либо М/В25105.

Таким образом, химическая индукция ветвления однолетних саженцев, химический контроль за нежелательными побегами открывает возможность создавать необходимые саженцы для интенсивного сада. Наблюдения за такими деревьями в саду отмечают увеличение урожайности на 3–4-й год в два раза по сравнению с контрольными деревьями.

Глава 3. РАЗМНОЖЕНИЕ САДОВЫХ РАСТЕНИЙ *IN VITRO*

3.1. Теоретические основы клонального микроразмножения

Многие способы вегетативного размножения (прививка, черенкование) известны с незапамятных времен. Практически они без изменений дошли до наших дней и широко используются в практике питомниководства. Любой способ вегетативного размножения применяется для поддержания и распространения определенного генотипа с целью получения максимальной прибыли. Естественно, что научный прогресс не мог не обратить внимания и на такой древний технологический процесс как размножение. И если в настоящее время результаты этого процесса дополняют существующие способы размножения, то в недалеком будущем традиционное понятие питомник прекратит свое существование для некоторых культур.

Ряд фирм на Западе выпускает посадочный материал стоимостью несколько сот миллионов долларов, используя достижения в области биотехнологии. Одним из направлений биотехнологии является клональное микроразмножение. С середины 70-х годов оно получило максимальное развитие, дав миру эффективную технологию размножения. Клональное микроразмножение – массовое бесполое размножение растений в культуре тканей и клеток, при котором возникающие формы растений генетически идентичны исходному экземпляру.

Отправной точкой клонального микроразмножения следует признать те физиологические опыты, которые были связаны с выращиванием в песке изолированных почек тополя, ясеня и других культур. В конце 1940-х годов на простой по составу среде успешно культивировались верхушки побегов папоротника. Однако культура апексов на таких средах не удавалась.

Фундаментальная работа Скуга и Миллера позволила установить различие в дифференциации органов растений в зависимости от соотношения в среде ауксинов и цитокининов. Однако практи-

ческое использование этого открытия впервые предложил Морель для размножения орхидей. Долгое время метод размножения *in vitro* не мог применяться для целого ряда растений вследствие низкого коэффициента размножения.

И только после синтеза цитокинина – 6-безиламинопурина – и введения его в питательную среду позволило ряду ученых заявить о создании нового метода промышленного размножения. Немедленно этот метод был взят на вооружение многими фирмами, занимающимися размножением садовых растений. Большинство ученых в своих опытах стремились достичь как можно большего коэффициента размножения.

30-летний опыт промышленного использования метода клонального микроразмножения, позволяет несколько по иному оценить его преимущества и проблемы. Уже не встретить в научной литературе высказываний о том, что коэффициент размножения может достигать 1: 10, хотя он теоретически остается возможным, но нецелесообразным по ряду причин.

Размножение растений *in vitro* основано на таких законах биологии таких как: тотипотентность клеток, апикальное доминирование, регенерация. В настоящее время существуют и применяются несколько способов размножения *in vitro*. Они характеризуются различной степенью генетической стабильности, требованиями технического обеспечения, коэффициентом размножения. Классификация этих способов дана в работах Р.Г. Бутенко и Т. Мурасиге. Различные способы клонального микроразмножения предполагают:

- получение растений из недифференцированных тканей без стадии образования каллуса;
- получение каллуса и регенерация из него растений;
- получение каллуса, превращение его в суспензию клеток и регенерацию из них растений;
- получение из клеток биполярных структур, способных образовывать зародыш;

- получение растений через активацию к росту существующих на эксплантах боковых почек и образование новых в процессе культивирования.

Размножение растений тем или иным способом *in vitro* обусловлено морфогенезом, то есть возникновением и преобразованием клеток, тканей и органов. Причины дифференциации клеток и образования органов растений – это два основных вопроса размножения *in vitro*.

Процесс дифференциации клеток и образования органов идет в такой последовательности: меристематические клетки конуса нарастания, делясь, образуют плотную многослойную популяцию, в которой обмен веществ в клетках создает по радиусу популяции градиенты факторов среды. Градиенты активируют гидролитические ферменты в клетках расположенных внутри популяции. Ферменты лизируют органоиды клеток, превращая их вначале в сильно вакуолизованные клетки, а затем в членики сосудов и ситовидных трубок. По ним внутрь популяции транспортируются метаболиты. Меристематические клетки популяции, контактирующие с проводящими клетками, локально делятся, образуя зачатки органов. Таким образом, трофические факторы могут ориентировать деление клеток в популяции, а, следовательно, состав питательных сред, условия выращивания растений *in vitro* должны быть основными объектами изучения с целью получения желаемой реакции (рис. 7).

В настоящее время наибольшее развитие получило размножение через активацию к росту существующих на эксплантах боковых почек. Задача этого способа обеспечение интенсивного образования конусом нарастания листьев, а в их пазухах боковых почек, способных к дальнейшему росту, то есть необходимо ослабление апикального доминирования. Боковые меристемы обычно присутствуют в каждой пазухе листа. Однако только незначительная часть их развивается в побеги.

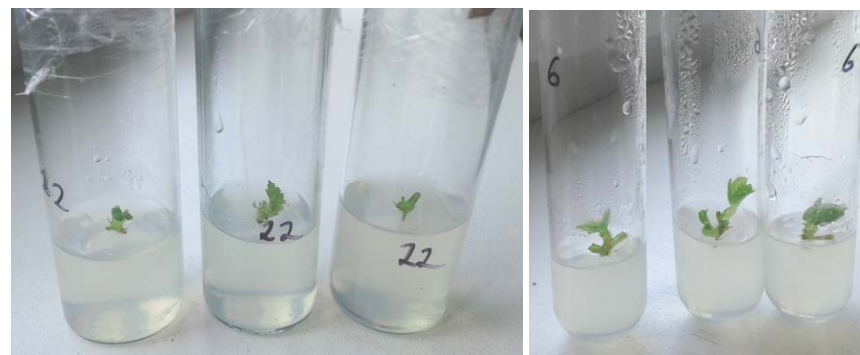


Рис. 7. Развитие регенерантов из меристематических апексов

Степень апикального доминирования варьирует в зависимости от вида растений, интенсивности света, снабжения азотом. При этом ключевыми факторами являются гормоны. Основные положения апикального доминирования известны. Ауксины синтезируются в апексе и примордиальных листьях, перемещаются вниз, стимулируют образование ингибиторов, которые проникают в боковые почки и препятствуют их росту.

Регулирующая роль в апикальном доминировании отводится уровням эндогенных ИУК, цитокининов, АБК и Са. Для начального роста пазушных почек необходимы цитокинины, которые синтезируются в корнях. Таким образом, ауксины и цитокинины – два главных действующих гормона в апикальном доминировании. Определенные соотношения этих двух гормонов в питательной среде позволяют либо снять апикальное доминирование и получить конгломерат боковых побегов, которые разделяются и повторно культивируются на питательных средах, а затем укореняются после достижения необходимого количества побегов, либо получить единственный побег достаточной длины непосредственно из первичного экспланта, с последующим делением его на однопочковые черенки.

Первый способ чаще используют для размножения большинства плодовых, ягодных и декоративных культур. Он может про-

ходить по классической схеме, предложенной Мурасига, либо процесс укоренения побегов проводят *in vivo*, что при достаточном проценте укоренения может сократить себестоимость растений на 30–35 %.

Укоренение побегов в субстрате способ эффективный, но для ряда культур нецелесообразный из-за потерь, которые достигают 50 % и больше. Пролиферация пазушных почек возможно более эффективный способ по сравнению с размножением черенкованием единичного побега, если он не сопровождается развитием каллуса и адвентивных побегов.

Культура изолированных органов и тканей растений в начале использовалась как метод исследований физиологии растений. Он позволил понять такие явления как полярность, дедифференциация и сделать предположения о тотипотентности клеток. Довольно длительный период характеризуется многочисленными попытками подобрать подходящую питательную среду и создать благоприятные условия для выращивания отделенных от цельного растения органов, тканей и клеток. Большинство авторов этих работ ставили своей задачей получить неограниченный рост эксплантов.

Поэтому составы большинства питательных сред, созданных в начале исследований по культуре тканей и клеток, стимулируют развитие каллуса. Однако некоторые из них послужили основой для разработки питательных сред, удовлетворяющих требованиям клонального микроразмножения. Это минеральный раствор Кнопфа, среды Уайта, Хеллера, Нича, Мурасиге и Скуга, которые в свою очередь были созданы на основе вегетационных опытов, изучающих питание в водных и песчаных культурах для выращивания различных растений.

Составы питательных сред можно подразделить на неорганический органический и природный комплекс. Неорганический комплекс делится на макро- и микроэлементы. К органическому

комплексу относятся витамины, аминокислоты, регуляторы роста, фенольные соединения, сахара. Природный комплекс представлен в основном агар-агаром, но для специальных целей могут быть применены кокосовое молоко, мед, пыльца.

Питательная среда заменяет экспланту стебель, взрослые листья и корни. Физический и химический состав питательной среды должны обеспечить поступление воды и ионов в эксплант. Водный потенциал питательных сред отличается от водного потенциала почвенного раствора. Тем не менее, он оказался оптимальным для выращивания растений *in vitro*. Для успешного клонального микроразмножения содержание макро- и микроэлементов в питательной среде должно определяться тщательно с учетом вида растения и даже сорта. Это необходимо, так как питательные среды отработанные для одних условий в полной мере не могут соответствовать для других лабораторий. Условия выращивания могут влиять на метаболизм синтезируемых веществ и компонентов, добавленных в среду.

Неорганические и органические вещества, входящие в состав питательных сред, выполняют те же функции, что и при питании интактных растений. Однако их концентрация в питательных средах гораздо ниже.

Длительное время у растений *in vitro* отсутствует корневая система, что вынуждает экспланты изменять пути поступления тех или иных элементов в клетки. Поэтому форма их применения имеет большое значение для *in vitro*, по сравнению с *in vivo*. Количество неорганических веществ в питательных средах колеблется от 10 до 20 и более. Вопрос о составе сред и соотношении в них отдельных неорганических элементов является, пожалуй, наименее отработанным разделом исследований клонального микроразмножения, несмотря на огромное количество публикаций. Приводить состав всех питательных сред, которые применялись многими авторами в процессе клонального микрораз-

множения подовых, ягодных и декоративных растений, по-видимому, нет необходимости, так как они фактически мало отличаются по качественному составу. Следует отметить либо отсутствие в некоторых средах KJ , $CoCl_2$, либо введение в среду Ca , K , Na в иных формах. Большинство работ выполнено на основе минерального состава питательных сред Мурасиге и Скуга, Уайта, Хеллера, Нича, раствора Кнопа. Многие растения удовлетворительно размножаются на этих средах. Однако по мере введения в культуру новых видов растений и возникновения проблем с их клональным микроразмножением, осмысления причин, создающих эти проблемы, появилась необходимость в изменении состава питательных сред.

Одни авторы пытались увеличить количество боковых побегов, уменьшить образование каллуса, улучшить укоренение и адаптацию, используя $1/2-1/10$ концентрации макро и микроэлементов стандартных сред, другие изменяли отдельные элементы. Для каждого сорта оптимальная питательная среда должна подбираться индивидуально.

В настоящее время на разных этапах клонального микроразмножения применяют среды Мурасиге и Скуга (1962), Уайта (1963), Хадсона (1946), Линсмайера и Скуга (1965), Морреля и Миллера (1964), Гамборга (1968), Кнопа и Бертелота (1974), Барата и Рао (1977), Филлипса и Коллина (1979), Андерсона (1980), Мак-Коуна (1981), Грешофа и Дау (1982). Составы питательных сред, применяемых при размножении садовых растений, представлены в табл. 1. Состав питательной среды на каждом этапе размножения *in vitro* должен обеспечивать оптимальные условия, как в химическом, так и физическом отношении. Опыты с японской вишней подтверждают предположение о том, что солевой состав питательной среды иногда является более важным фактором при клональном микроразмножении, чем регуляторы роста.

Таблица 1

Солевой состав сред, мг/л

Минеральные соли	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Мурасиге и Скуга	Кнопа	Фоссарда	Андерсона	ВТМ	В5	Бокюса	Лепуавра	Хеллера	Мюллена	Енита	ДКВ	
	1650	1900	440	370	170	1000	170	500	270	500	250	4053	265
NH_4NO_3	1900	440	370	170	1000	170	500	270	500	250	4053	265	1968
KNO_3	440	370	170	1000	170	500	270	500	250	4053	265	1968	1968
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	370	170	1000	170	500	270	500	250	4053	265	1968	1968	1968
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	170	1000	170	500	270	500	250	4053	265	1968	1968	1968	1968
KH_2PO_4	1000	170	500	270	500	250	4053	265	1968	1968	1968	1968	1968
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$(NH_4)_2SO_4$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Na_2SO_4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
K_2SO_4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	27,8	37,3	27,8	27,8	27,8	30	27,8	27,8	27,8	26,6	27,8	33,2	33,2
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3	36	37,3	37,3	37,3	24,7	37,3	45,4	45,4
Na_2EDTA													

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
					Микроэлементы								
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	3,1	6,2	6,2	3	6,2	6,2	6,2	0,05	6,2	4,8	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	22,3	7,6	16,9	22,3	10	16,9	0,8	22,3	2	–	33,5	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,06	0,025	–	0,03	0,025	0,025	0,025	0,05	–	–	
CuSO ₄	0,025	0,025	0,02	0,025	0,25	0,03	0,025	0,025	0,025	0,05	–	0,25	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6		3,2	8,6	2	8,6	8,6	8,6	–	–	–	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,03	0,25	0,2	0,3	0,25	0,25	0,25	–	2	0,4	
KJ	0,83	0,83	0,4	0,3	1,8	2,5	0,83	0,08	0,83	0,5	–	–	
NiCl ₂ ·6H ₂ O	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,05	–	–	

3.2. Влияние физиологически активных веществ на клональное микроразмножение растений

Большинство процессов роста и развития, как у целых растений, так и у их отдельных органов *in vitro* могут нормально осуществляться лишь при участии в них физиологически активных веществ. Без регуляторов роста невозможно получить достаточный коэффициент размножения и прохождения отдельных этапов морфогенеза.

В питательных средах используют отдельно или в сочетаниях:

- ауксины (индолилуксусную, индолилмасляную, нафтилуксусную, индолил-3-пропионовую кислоты);
- цитокинины (кинетин, 6-бензиладенин, зеатин, 2-изопентил, тидиазурон, 3-аминопиридин);
- гиббереллины (гибберелловую кислоту).

В меньшей мере применяют другие регуляторы роста: ретарданты, ингибиторы, антагонисты гормонов растений.

После того как регулятор роста попал в эксплант, он перемещается по флоэме или ксилеме, проникает в клетку. Будучи аналогом природных гормонов, он может вызвать множество физиологических процессов. Некоторые из них очень важны, а другие вредны при клональном микроразмножении. Искусство использования регуляторов роста состоит как раз в том, чтобы свести к минимуму нежелательные эффекты. Достигнуть этого можно, применяя определенные соотношения, концентрации и время применения регуляторов роста на фоне оптимального солевого состава питательной среды. Различная реакция клеток или тканей на фитогормоны может быть результатом изменения в количестве рецепторов гормонов, изменения в родстве рецептора к гормону, изменения в свойствах регуляторов роста поглощающей системой.

Многие исследования были связаны с введением на различных этапах клонального микроразмножения активированного угля. Наличие его в составе питательной среды обеспечивало как

положительные, так и отрицательные результаты. Объяснением данных различий может быть способность активированного угля поглощать регуляторы роста.

3.3. Проблемы и возможности клонального микроразмножения

Размножение – присущее всем организмам свойство воспроизведения себе подобных, обеспечивающее непрерывность и преемственность жизни. Существует три типа размножения: бесполое, половое, вегетативное.

Вегетативное размножение – это бесполое размножение, в основе которого лежат биологические законы и явления:

- митотическое деление клеток, которое приводит к умножению клеток с полным сохранением у них наследственных признаков и свойств;
- регенерация – восстановление недостающего органа, либо отдельных тканей;
- аффинитет – совместимость прививаемых компонентов;
- тотипотентность – способность клетки дать начало целому организму;
- апикальное доминирование – способность в большей или меньшей мере развивать боковые побеги.

В настоящее время плодовые и ягодные растения можно размножить с помощью различных прививок, отводков, черенков, культуры меристематических верхушек, искусственных семян. Эффективность этих способов различна (коэффициент размножения, сохранность сорта, стоимость полученных растений). Очевидно, что различно и их место, объем в системе производства посадочного материала.

Метод клонального микроразмножения имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными способами вегетативного размножения и позволяет:

- быстро размножить небольшие количества ценных растительных форм (новые сорта);
- быстро размножить трудно размножаемые традиционными способами растения (например, подвой для персика);
- произвести большой объем безвирусных растений в условиях, исключающих повторное заражение;
- сохранять растительный материал в условиях *in vitro* до 10 лет и более;
- работать вне зависимости от времени года и условий погоды;
- легко пересылать большое количество материала на большие расстояния без опасения передачи опасных карантинных болезней, насекомых;
- дать материал для еще более эффективного метода размножения растений искусственными семенами;
- произвести растения, у которых повышается способность к вегетативному размножению традиционными способами.

Однако клональное микроразмножение имеет и недостатки. Прежде всего, большие затраты труда. Во Франции пытались создать роботизированную систему клонального микроразмножения, которая способна разделить конгломерат на отдельные побеги. На данный момент система сложная и дорогая.

Оборудование и обычной лаборатории дорогое. Стоимость лаборатории для производства 100 тыс. растений несколько десятков тысяч долларов. Информацию о методиках размножения отдельных растений можно найти в многочисленной литературе. Однако часто их необходимо изменять, приспособив к условиям конкретной лаборатории. Поэтому производственные лаборатории должны иметь и исследовательскую группу.

Для того чтобы в полной мере использовать потенциал клонального микроразмножения, необходимо решить биологические, организационные, экономические и технологические проблемы, которые сопровождают данную технологию. Оно требует другого

технического обеспечения, нежели традиционные способы размножения, то есть специальные лаборатории, которые в некоторых странах превратились в заводы. Успех таких заводов зависит от знаний и практических навыков персонала, наличия и качества необходимых реактивов, доступ к растениям, требуемым на рынке.

Несмотря на все перечисленные трудности в мире создано огромное число коммерческих лабораторий. Первые лаборатории в США начали создаваться еще в середине 60-х годов. Наиболее развитой лабораторией того времени считалась лаборатория Гавайского университета. Неудивительно – этой лабораторией руководил доктор Тошио Мурашига.

Наиболее крупная лаборатория в мире – Твайфордская лаборатория в Англии была создана в 1959 г. В период своего развития она производила более 10 млн растений. В лаборатории работало 120 операторов, которые размножали 12 различных видов растений, несколько сотен клонов. Мощность лаборатории и профессионализм сотрудников таков, что за 6 месяцев она в состоянии была произвести 10000 растений от одного маточного. Набор культур был очень разнообразен. В лаборатории размножали картофель, капусту, косточковые, подвой, розы, пальмы, герберу, папаю, лилии, каучуконосы, киви. Продукция поставлялась в Австралию, Бельгию, Италию, США, Африку, и только 5 % оставалась в Англии.

Для того чтобы ежегодно производить 2 млн растений *in vitro*, необходимо иметь лабораторию площадью 200 м², культуральную комнату 500 м² со световыми стеллажами с полезной площадью 2000 м², и теплицу, оборудованную искусственным туманом 8000 м². Оборудование, квалификация персонала должны обеспечить минимальные потери (не более 5 %) на всех этапах размножения. Эффективность работы лаборатории должна быть такой, чтобы в течение месяца получать 1000 побегов/м² для укоренения.

Поэтому многие страны идут на совместные разработки в области клонального микроразмножения. Например, в Греции была

создана международная лаборатория для производства подвоев персика, а семь стран Европы создали кооперацию по разработке технологии размножения *in vitro* кордилены. В Англии в компьютерном варианте имеется база данных всех работ, выполненных в мире по клональному микроразмножению. В 1988 г. в мире уже насчитывалось более 400 центров по культуре ткани. Продукция только декоративных культур ежегодно оценивается в несколько миллионов долларов.

В США есть питомники, выпускающие 1 млн азалий в год методом *in vitro*. Для некоторых культур (фикус) уже сейчас отмечают экономическую целесообразность их размножения *in vitro* по сравнению с традиционными способами размножения. В то же время размножение сосны *in vitro* в 5 раз дороже по сравнению с размножением черенками и отводками. Математическая модель влияния факторов на стоимость растений, полученных *in vitro*, показывает значимость специализации, вида предлагаемой продукции.

Процесс клонального микроразмножения состоит из ряда последовательных этапов, каждый из которых имеет свою значимость и создает определенные проблемы. Для некоторых культур требуется семь этапов, чтобы получить целостное растение, каждый этап эффективно проходит при использовании конкретной питательной среды.

Первым этапом является отбор эксплантов и введение их в культуру. Это наиболее затратный этап клонального микроразмножения. Производительность мала, а потери большие. Промышленное клональное микроразмножение часто сталкивается с бактериальным и грибным заражением эксплантов. Лаборатории, планирующие производить несколько миллионов растений в год, должны начинать производство с не менее 2000 стерильных культур. Маточные растения повсеместно заражены большим набором микроорганизмов. Особенно ощутимы потери эксплантов на пер-

вом и последующих этапах из-за бактериального заражения. Так как оно проявляется у основания экспланта, то, очевидно, что это внутренняя инфекция. Микробиологические исследования показали, что это в основном *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas*, *Enterobacter asburiae*, *Alcaligenes*.

В настоящее время отработан и рекомендован большой набор стерилизующих веществ, которые можно применять для получения стерильных культур: гипохлорид кальция и натрия, перекись водорода, бромная вода, нитрат серебра, сулема, диацид, 70 % спирт.

Задача первого этапа не только получить стерильные экспланты, но и экспланты способные к дальнейшему росту. Очень часто, например, использование сулемы повышает степень стерильности, но экспланты долго не начинают расти. Поэтому выбор стерилизатора зависит от чувствительности и типа экспланта. В научной литературе представлены несколько путей решения проблемы первого этапа.

Использование эксплантов с растений, выращиваемых в теплице, либо подвергнутых термотерапии; предварительная стерилизация при небольших концентрациях, посадка на питательную среду, а через 3–5 дней стерилизация при более высоких концентрациях. Либо введение в питательную среду веществ, которые провоцируют быстрое проявление инфекции. Данная методика позволяет уже на первом этапе отобрать чистые культуры. Однако поверхностная стерилизация часто не решает проблему, особенно при размножении древесных растений. Степень инфицированности зависит от времени введения в культуру. Второй путь – использование антибиотиков, фунгицидов в питательной среде, что позволяет устранить стойкую инфекцию. Однако тип, концентрация антибиотика, продолжительность обработки может варьировать для различных культур. Часто одного препарата недостаточно, совместное применение вызывает слабое развитие листьев, хлороз, действие антибиотиков видоспецифично.

При использовании в питательной среде стрептомицина отмечается изменение в мужской фертильности кукурузы. Получение стерильных культур зависит от вида растения, его возраста, времени взятия и размера экспланта, системы стерилизации. У растений с сильным опушением получить достаточное количество стерильных культур, используя обычную методику, очень трудно. Для увеличения количества стерильных культур черенки растений подвергают выгонке в специальных растворах.

Хорошие результаты получены при использовании на первом этапе питательной среды, содержащей большие концентрации агар-агара. Отделение экспланта от маточного растения, его стерилизация являются двойным для него шоком. Поэтому первоначальное развитие экспланта, начало его быстрого размножения зависит не только от вида растения, стерилизатора, но и системы стерилизации.

3.4. Физиологические расстройства и возможные генетические отклонения растений *in vitro*

Одним из основных аргументов возможного интенсивного размножения растений *in vitro* является утверждение, что физиологические процессы у эксплантов происходят при строго контролируемых оптимальных условиях. Действительно, мы можем задать необходимые параметры температуры, света, влажности, состава питательной среды. Однако следует отметить, что экспланты, отделенные от маточного растения и подвергнутые стерилизации, уже находятся в стрессовом состоянии, а изменения в составе питательной и газовой среды в процессе выращивания его усиливают.

Стресс провоцируется изменениями условий произрастания, которые вызывают сокращения в росте и изменения морфологии растений. В настоящее время определены основные причины появления физиологических расстройств (стекловидности) при клональном микроразмножении. Среди факторов, ответственных за это, особое значение имеют: высокая влаж-

ность воздуха в сосудах, питательные среды, содержащие значительное количество солей аммония, сахаров, витаминов, высокие дозы регуляторов роста.

Под термином «стекловидность» следует понимать заполнение межклеточного пространства жидкостью, что, прежде всего, связано с изменением водного обмена или водного режима растений. Одной из особенностей водного режима растений в условиях *in vitro* является отсутствие либо очень слабая транспирация и, как результат, перенасыщение тканей водой. Дальнейшее размножение таких побегов приводит к повторяемости развития аномальных побегов в 89,5 % случаев.

Морфологически стекловидные боковые почки (будущие стекловидные побеги) характеризуются зеркальным блеском их примордиальных листьев.

В естественных условиях движущей силой для транспирации служит разница водного потенциала между растениями и атмосферой. В замкнутой системе *in vitro* такой потенциал отсутствует. Вследствие этого устьица растений, культивируемых *in vitro*, все время остаются открытыми и теряют способность закрываться. Снижение влажности воздуха в сосуде до 85–80 % приводит либо к гибели эксплантов, либо к снижению коэффициента размножения.

Влажность воздуха в сосуде зависит от концентрации и типа гелирующего вещества, размера сосуда, типа покрытий. Высокая влажность воздуха (более 90 %) вызывает у растений резкое сокращение перемещения кальция и, как результат, увеличение количества стекловидных растений.

Было показано, что увеличение концентрации агар-агара ограничивает диффузию макромолекул и доступность воды, однако уменьшает коэффициент размножения и укореняемость побегов *in vitro*. У стекловидных побегов на этапе пролиферации содержание кальция было в 4 раза меньше, чем у нормальных. У стекло-

видных растений увеличивается содержание К, Р, S, Fe вне зависимости от влажности воздуха в сосудах. Листья стекловидных растений имеют более высокий уровень редуцированных сахаров и сахарозы и очень мало инозитола. Нормальные растения способны *in vitro* синтезировать инозитол на среде, не содержащей его. Большие отклонения отмечают в содержании фенольных соединений. Стекловидные растения яблони содержали в 7 раз меньше флоридина.

Степень стекловидности зависит от концентрации и типа углеводов, используемых при клональном микроразмножении. Замена в среде сахарозы на фруктозу или уменьшение ее концентрации резко сокращает стекловидность у фишашки.

Анатомическое строение стекловидных растений резко отличается от нормальных. Увеличивается в 4 раза воздушное пространство, развивается менее дифференцированная ксилема, в большей степени получает развитие флоэма. Ткани стекловидных растений меньше содержат лигнина из-за уменьшения в 3–10 раз активности соответствующих ферментов.

Листья стекловидных растений имеют большие вакуоли клеток мезофилла, у них часто отсутствует палисадный слой. У листьев такого типа отсутствует кутикулярный слой, а у устьиц не функционируют замыкающие клетки.

При клональном микроразмножении у ряда видов растений наблюдается гуттация – процесс, посредством которого вода устраняется из терминальных трахеид, когда транспирационный поток ингибирован.

Воздействие на стекловидные растения темнотой, обработкой АБК и антитранспирантами, манитолом, высокими концентрациями CO₂, то есть факторами, которые закрывают устьица у нормальных растений, были не действенными *in vitro*.

Следует отметить, что даже устьица нормальных растений, полученных *in vitro*, очень медленно закрываются при соответст-

вующих условиях по сравнению с устьицами тепличных растений. У последних через 30 мин 100 % устьиц были закрыты, у растений, полученных *in vitro*, половина была открыта через 16 ч.

Согласно физиологическим исследованиям закрытие и открытие устьиц *in vitro*, так же как и *in vivo*, ассоциируется с изменениями содержания калия в замыкающих клетках. Но запускает механизм открытия устьиц цитокинин, который необходим для снятия апикального доминирования и пролиферации боковых побегов. Приблизительно через 2 мин после воздействия на эксплант цитокинином устьичная щель увеличилась в 2,7 раза больше, чем в контроле.

К сожалению, АБК, которая является регулятором устьичных движений в ответ на стресс *in vitro*, либо не синтезируется, либо не способна выполнять эту функцию. Было показано, что закрытие устьиц под влиянием АБК зависит от содержания CO₂, которое подвержено большим колебаниям в условиях *in vitro*, добавление в среду АБК (10⁻⁶ моль) способствовало развитию нормальных растений.

При культивировании растений *in vitro* высокая влажность и отсутствие движения воздуха не позволяют образовываться достаточному слою кутикулярного воска. Наличие кутикулярного воска сокращает в 500 раз кутикулярную транспирацию. Количество, композиция, структура воска зависит от качества света. Показано, что все эти параметры изменяются под влиянием ультрафиолетовой радиации. Однако качество стекла культуральных сосудов уменьшает действие ультрафиолетовой радиации. В то же время тургор замыкающих клеток, а следовательно, и работа устьиц, зависит от воздействия ультрафиолетовой радиации. Поэтому очевидно кутикулярный слой растений *in vitro* отличается от обычных растений.

Таким образом, сверхпроводненность тканей является результатом высокой влажности в сосудах, нарушения анатомического

строения растений *in vitro* в результате применения регуляторов роста и содержания агар-агара в питательной среде.

Поглощение эксплантами цитокинина, в свою очередь, зависит от степени агаризованности питательной среды. С уменьшением концентрации агар-агара поглощение 6-БАП увеличивается в 3,5 раза. Уменьшение длины побегов, отсутствие доминирования верхушки побега предполагает, что отклонения от нормы связаны с изменением в транспорте ауксина. Ауксин определяет в большей мере ориентацию и дифференциацию проводящих тканей. Поэтому ненормальная структура листа может быть следствием и результатом потери транспортной полярности ауксина. При выращивании растений *in vitro* они выделяют различные вещества в атмосферу сосуда и в питательную среду.

На всех стадиях культивирования выделяется значительное количество этилена. Особенно много его производят ткани эксплантов, выращиваемых на жидкой питательной среде, что увеличивает количество стекловидных растений. Стекловидные растения превращают АСС в этилен с большой скоростью. Установлено, что этилен нарушает движение замыкающих клеток устьиц.

Синтез этилена тканями стимулируется цитокинином и ауксином, вводимыми в питательную среду. Наличие этилена в условиях *in vitro* следует рассматривать как положительный, так и как отрицательный фактор. Этилен делает ткани более рыхлыми, увеличивая синтез целлюлозы, которая, в свою очередь, разрушает клеточные стенки. Во всех гиперпроводненных растениях наблюдается увеличение содержания железа, этилена, накопление токсичных, активных форм кислорода.

Этилен ингибирует базипетальный транспорт ауксина *in vitro*. Предполагают, что ауксин может быть выведен из транспортной системы в клетки, где он не способен перемещаться. Этилен, как гормон старения, при избыточном его содержании вызывает хлороз и опадение листьев, а также некроз верхушек

побегов *in vitro*. Этилен, выделяемый эксплантами, поглощается питательной средой, что сказывается на развитии корневой системы. Через 4 недели при уровне этилена в сосуде выше 1 нл/ч появляются более короткие, толстые и часто винтообразные корни. Скручиваемость корней увеличивалась с увеличением уровня этилена. Однако увеличение синтеза тканями этилена положительно коррелирует с прорастанием латеральных почек *in vitro* и отрицательно, если заблокировать его синтез.

Введение в среду АСС, предшественника этилена, стимулировало прорастание боковых почек, но не могло заменить цитокинин. Добавление AVG (ингибитора синтеза этилена) сокращало синтез этилена, уменьшало пролиферацию боковых побегов. Применение экзогенного этилена *in vitro* восстанавливало рост латеральных побегов. Эти результаты позволяют предположить, что цитокинин и этилен – оба играют существенную роль в инициации боковых почек.

Таким образом, синтез эксплантами этилена зависит от присутствия цитокинина, возможного газообмена в сосудах, от использования веществ, которые либо ингибируют, либо стимулируют его синтез.

Растения *in vitro* на протяжении всего периода выращивания находятся под влиянием этилена. На стадии пролиферации боковых побегов – из-за необходимости использовать цитокинины, на стадии укоренения – ауксинов. Как результат, большой процент гибели растений при пересадке их в нестерильные условия. Серьезная проблема при клональном микроразмножении растений – выделение в питательную среду фенольных соединений. Ее решение возможно частично с помощью частых пересадок, введением веществ антиоксидантов, либо помещение экспланта в стерильную дистиллированную воду.

Современные теоретические исследования в области клонального микроразмножения пытаются решить две основные

проблемы. С одной стороны – это достижение достаточного коэффициента размножения, с другой – сведение к минимуму возможности отклонения от сорта. Первые данные о нестабильности в культуре тканей появились в 1961 г. Понимание механизмов, которые порождают нестабильность и соматоплазматическую изменчивость *in vitro*, необходимо по нескольким причинам.

Если соматоклональная изменчивость должна использоваться в плане улучшения растений, желательно увеличить частоту ее встречаемости. В тех случаях, когда важно единообразие растений, как, например, при быстром микроразмножении, или сохранение зародышевой плазмы, необходимо уметь контролировать механизмы, обуславливающие изменчивость. Одно из наиболее важных последствий соматоклональной изменчивости заключается в увеличении частоты хромосомных нарушений в процессе культивирования *in vitro*.

При размножении растений *in vitro* могут возникнуть отклонения, которые не передаются при половом размножении (ювенилизация, раннее плодоношение, задержка цветения). Могут возникнуть генетические изменения (анеуплоидия, полиплоидия, транслокация, инверсия), которые вызывают генетическую нестабильность при мейозах.

Вероятность соматоклональной изменчивости возрастает, если микроразмножение сопровождается образованием каллуса. В клетках каллуса были обнаружены полиплоидные и анеуплоидные изменения. Полиплоидные клетки могут возникать при делении эндополиплоидных клеток исходного экспланта. Однако большинство полиплоидов и анеуплоидов возникает в процессе культивирования.

Возможность отклонения от сорта зависит от генома, склонности его к образованию каллуса, типа экспланта, продолжительности культивирования, способа размножения, состава питательной среды. У диплоидных растений среди потомства регенеран-

тов значительные хромосомные аномалии встречаются редко, у полиплоидных видов чаще. У земляники, культура меристем которой широко используется для клонального микроразмножения, отмечают сортовые различия в частоте растений, отклоняющего тип. Соматоклональная изменчивость адвентивных побегов, развившихся из листьев, минимальна, но вероятна.

Известно, что продолжительное культивирование приводит к увеличению развития каллуса, способности регенерации побегов из него и из специализированных тканей и, как результат, к увеличению частоты отклонения от сорта. Мутагенная активность культуральной среды и, особенно регуляторов роста, зависит от типа регулятора роста, его концентрации. Нельзя исключать и стрессовую роль стерилизующих веществ в возникновении отклонения от сорта.

Гораздо чаще при клональном микроразмножении возникают морфозы. Они проявляются в увеличении силы роста и ветвления, способности к укоренению и цветению, задержке вступления в плодоношение. Для того чтобы определить затронут ли геном, у видов с половым способом размножения необходимо произвести соответствующее скрещивание. Для видов, размножаемых бесполом путем, сохранение признака, по крайней мере, в двух последовательных циклах клонального микроразмножения, является гарантией генетической основы данного изменения. Ну и конечно необходимо проводить генетический анализ.

В последние годы возросла значимость внутриклоновой изменчивости в связи с практическими успехами размножения клонов *in vitro*. Совершенно очевидно, что сорта многолетних культур содержат скрытые генетические вариации, так называемые соматические клоны, которые могут включать варьирование признака. Все это усиливает важность контроля генетической стабильности клона. Однако, чтобы изучить проблему нужно работать с одним клоном, размножая его *in vitro* и обычными способами.

Некоторые красные клоны сортов яблони проявляют определенную нестабильность, а поэтому необходима осторожность при их размножении *in vitro*.

В то же время фиалка «Pinwheel flowering» – химера, которая образует двухцветные цветы, при размножении ее листьями дает 30 % растений с такими цветами и 70 % – одноцветных. Размножение ее *in vitro* обеспечивает получение 96 % растений с двухцветными цветами.

Результаты клонального микроразмножения даже периклиальной химеры логанберри позволяет утверждать, что при оптимальных условиях размножения отклонения от сорта незначительны. Из 3698 растений только одно имело шипы.

Вместе с тем, чтобы быть экономически целесообразным, скорость размножения *in vitro* должна превышать скорость размножения обычными методами, но при этом необходимо свести к минимуму отклонения от сорта, особенно для многолетних плодовых и ягодных культур.

Основная причина отклонений – развитие каллуса в процессе размножения, которое происходит в основном на поверхности среза. Интенсивность его развития зависит от времени введения в культуру, состава питательной среды, размера экспланта и его первоначального положения на маточном растении. Более крупные экспланты в большей мере поддерживают генетическую стабильность.

Продолжительное культивирование эксплантов увеличивает вероятность хромосомных нарушений клеток каллуса. Поэтому особенно важно его отсутствие на этапе введения экспланта в культуру. Некоторые фенотипические изменения, которые возникают как ответная реакция на культивирование *in vitro*, могут быть положительны и должны использоваться в практике питомниководства. Например, ювенилизация, очень интересный момент для трудно укореняемых видов.

Укореняемость черенков трудно укореняемых подвоев яблони, сливы, груши увеличилась при использовании маточников, заложённых растениями, полученными *in vitro*. Многие морфогенетические изменения, наблюдаемые у растений, полученных *in vitro*, исследователи связывают с неоптимальным составом питательной среды, особенно на этапе пролиферации.

Эти явления можно контролировать, изменяя состав, концентрации регуляторов роста. Промышленное внедрение клонального микроразмножения шло параллельно с изучением роста и развития растений, полученных *in vitro*. Для многих видов отмечено усиление роста, урожайности, незначительная задержка во времени вступления в плодоношение плодовых культур, либо цветение на второй год после посадки. Сравнить поведение растений в поле, полученных различными авторами, не всегда правомерно, так как последствие клонального микроразмножения зависит от сорта, состава питательной среды, количества пассажей, условий культуральной комнаты, воздействий после пересадки в нестерильные условия. Растения земляники F₀, размноженные на питательной среде по прописи MS, были в 2–3 раза урожайнее, по сравнению с растениями, размноженными на среде B5. Было показано, что урожайность земляники, заложение усов контролируется условиями культуральной комнаты, воздействием низких положительных температур, временем пересадки в поле и концентрацией 6-БАП.

3.5. Биологические основы ризогенеза садовых растений *in vitro*

Историю садоводства можно разделить на три этапа:

- корнесобственное садоводство, основанное на семенном размножении;
- привитое садоводство;
- корнесобственное садоводство, основанное на вегетативном размножении.

Размножение растений черенками привлекает своей простотой и эффективностью. Значимость этого способа будет возрастать

по мере создания сортов, сочетающих в себе хозяйственно-ценные признаки сорта и подвоя. Растения на собственных корнях отличаются однородностью и физиологической целостностью. Плохое укоренение лимитирует промышленное размножение важных клонов многих видов не только черенками, но и *in vitro*. Несмотря на активные исследования, а на текущий момент в научной литературе отмечено свыше 2 млн опытов по укоренению, полная картина адвентивного формирования корней остается неясной.

Процесс корнеобразования следует рассматривать как серию различных биохимических, физиологических и гистологических событий. Адвентивные корни у черенков образуются в различных тканях. Место формирования корней зависит от возраста тканей побега, времени нарезки черенков. Адвентивные корни у молодых черенков возникают эндогенно из паренхимы, у полуодревесневших во флоэмной паренхиме, у зрелых – в зоне камбия.

Они могут случайно заложиться в эпидермисе и каллусе. Было установлено, что близость к сосудистым тканям предрасполагает клетки закладывать корневые примордии. Корневые меристемы у черенков чаще всего формируются в местах пересечения камбия и флоэмы сердцевидными лучами.

Технология клонального микроразмножения включает в себя следующие этапы (рис. 8):

- введения в культуру *in vitro* – изоляция меристематических апексов для получения растений регенерантов;
- мультипликации микропобегов – процесс активации регенерационного потенциала путем активации уже существующих в растении меристем;
- ризогенеза микрорастений – индукция возникновения адвентивных корней в условиях *in vitro*;
- адаптации - перевод растений-регенерантов из *in vitro* в нестерильные условия *ex vitro*.



Рис. 8. Технологический цикл технологии клонального микроразмножения

Место заложения корней влияет на жизнеспособность укорененных растений, особенно полученных *in vitro*. Было показано, что корни, развившиеся из каллуса у основания черенка, могут восполнить сосудисто-проводящую систему между корнем и надземной системой при зеленом черенковании. При размножении растений *in vitro* такие анатомические события, как правило, не происходят. Поэтому процесс корнеобразования *in vitro* требует более контролируемых условий его прохождения. В противном случае можно получить 100 % укоренения *in vitro* и 100 % гибель растений в нестерильных условиях, по причине нефункциональной корневой системы. При любых способах укоренения процесс адвентивного корнеобразования проходит 3–4 этапа.

Ризогенез зависит от взаимодействия таких факторов как гормоны, кофакторы, питание, ювенильность с факторами внешней среды, среди которых ведущую роль играют свет, температура, влажность (рис. 9).



Рис. 9. Укорененные растения-регенеранты винограда

Поэтому все способы воздействия на пролиферирующие культуры, отделенные побеги должны быть направлены на индукцию компетентных клеток и синтеза в них корнеспецифических белков. О необходимости контроля синтеза определенных белков говорят опыты, в которых некоторые ингибиторы синтеза

белков, например актиномицид Д, стимулируют корнеобразование. Предполагают, что он ингибирует синтез белков, препятствующих корнеобразованию.

Одна из особенностей размножения растений *in vitro* – ювенилизация. Однако этот процесс во многом определяется условиями культивирования. Если в процессе размножения в атмосфере сосуда накапливается этилен свыше 1 нл/ч, то пролиферирующие культуры принимают взрослый фенотип, что приводит к развитию компактных культур, появлению коротких, толстых, часто винтообразных корней.

Когда герметичность сосудов нарушалась, растения принимали ювенильный тип. Несмотря на ювенилизацию тканей в процессе пролиферации побегов *in vitro*, последующее их укоренение зависит от источника первичного экспланта.

Одним из основных условий корнеобразования при любых способах ризогенеза является этиоляция – процесс, предусматривающий исключение света в процессе корнеобразования. Поэтому подходы к укоренению *in vitro* должны отличаться от укоренения *in vivo*, так как мы можем контролировать многие биохимические и физиологические процессы образования и развития корней *in vitro*. Например, активность ауксиноксидазы зависит от качества света, температуры, pH, длины дня, типа фенолов. Все эти факторы влияют на укоренение.

Показано, что длительное нахождение побегов *in vitro* в темноте приводит к разрушению хлорофилла, уменьшению выживаемости растений в нестерильных условиях. Характер действия этиоляции *in vitro* зависит от вида растений. Она положительно влияет на укоренение побегов миндаля, маслины и не влияет на укоренение персика. Повторное укоренение *in vitro* этиолированных побегов сливы было более успешным по сравнению с укоренением побегов, развившихся в условиях света, то есть, как и *in vivo* этиоляция *in vitro* имеет пролонгирующий эффект. Потреб-

ность в свете растительных тканей, выращенных *in vitro* меньше чем *in vivo*.

Вместе с тем, укоренение черенков азалии *in vitro* уменьшилось с увеличением освещенности пролиферирующих культур. Даже кратковременное (10 мин) воздействие на пролиферирующие культуры красным и дальним красным светом влияло на последующую укореняемость побегов. Красный свет усиливал, а дальний красный ингибировал укоренение. Облучение уже образовавшихся корней светом приводило к подавлению удлинения корней на 40–50 %, при этом образование этилена увеличилось в 4 раза.

Методика укоренения *in vitro* имеет ряд преимуществ и недостатков по сравнению с укоренением зеленых и одревесневших черенков. К недостаткам следует отнести освещение основания побега, длительное воздействие ауксином, разнокачественность побегов, незначительный замкнутый объем, отсутствие или недостаточно интенсивный газовый обмен, специфический газовый состав, недостаточное содержание кислорода в зоне укоренения, возможная латентная стекловидность побегов, отсутствие транспирации, фотосинтеза и воздействие ультрафиолетовой радиации создают не только проблемы для укоренения, но и для последующей приживаемости в нестерильных условиях.

Неудивительно, что многие авторы считают успешное укоренение побегов *in vitro* ключевым этапом клонального микроразмножения. Исследования, которые направлены на изучение влияния отрицательных факторов при укоренении *in vitro*, можно разделить на несколько направлений: определение оптимального солевого, гормонального и углеводного состава питательной среды; влияние физических факторов; способов воздействия регуляторов роста; последствие этапа пролиферации.

Трудность интерпретации существующих данных связана с взаимодействием перечисленных факторов на процесс ризогенеза,

разнокачественностью побегов, работой с разными сортами и культурами.

Анатомические и физиологические исследования укорененных побегов яблони сорта Джонатан, полученных даже от одной меристематической верхушки с одного пассажа, показали серьезные отличия в анатомическом строении, интенсивности поглощения и деградации ауксина. Ответная реакция побегов на примененные ауксины изменилась под влиянием сахарозы, освещения, температуры. Способность к укоренению *in vitro* в научной литературе представлена широкой гаммой от легко укореняемых видов (земляника) до отсутствия укоренения (груша каллариана).

подавляющее большинство опытов по укоренению *in vitro* отмечают важность осмотического потенциала среды, который зависит от концентрации сахарозы, солевого состава, особенно азота и калия. Однако, как правило, минеральный состав питательной среды по прописи MS уменьшают в 2–8 раз или заменяют его на более разбавленную питательную среду, например укоренение побегов клюквы. Степень влияния сокращения концентрации солей в питательной среде зависела от содержания сахарозы и ауксинов. Часто укоренение побегов на разбавленной питательной среде проходило в отсутствие ауксинов и уменьшенной концентрации сахарозы. В то же время укоренение хосты лучше происходило в питательной среде по прописи MS без регуляторов роста, а побеги персика на среде без ауксинов погибали из-за пожелтения листьев и покоричневения корней. Укоренение побегов роз увеличивалось с увеличением концентрации сахарозы, с уменьшением ауксина и макросолей.

Таким образом, различные культуры требуют различной степени разбавления существующих питательных сред. Эффект от уменьшения концентрации макросолей повышается или понижается в зависимости от концентрации сахарозы и ауксинов. При этом ведущая роль отводится содержанию нитратного и аммиач-

ного азота. Отсутствие той или иной формы азота отрицательно влияет на укоренение например побегов роз.

Различные морфологические реакции требуют определенной pH питательной среды, которая может меняться в процессе ризогенеза. Изменение pH в свою очередь зависит от буферности питательной среды, которая, в свою очередь, зависит от солевого состава, тем самым влияя на поглощение ауксина. Характер прохождения ризогенеза зависит от водного потенциала питательной среды.

Современное промышленное размножение растений *in vitro* невозможно без использования регуляторов роста. Как правило, при укоренении используют аналоги ИУК. Большой процент укоренения отмечен при использовании в питательной среде кремнийорганических соединений.

В качестве индукторов корнеобразования в питательную среду вводят ИМК, НУК, ИУК отдельно или в сочетании. При использовании разбавленной питательной среды, на более поздних пассажах, добавление различных ауксинов слабо влияет на укоренение. Максимум укорененных побегов яблони был получен на питательной среде, содержащей 0,1 мг/л ИМК. Укоренение побегов различных культур требует различных концентраций ауксинов.

По одним данным процент укоренения побегов яблони возрастает с увеличением концентрации ИМК с 0 до 6,25 мг/л, по другим – дозы выше 0,1–0,5 мг/л препятствуют корнеобразованию, либо угнетают рост надземной и корневой системы. Укоренение актинидии было максимальным при содержании в среде ИМК 10 мг/л. Побеги легко укореняемых культур можно укоренять на питательных средах без ауксинов.

Проблемы укоренения *in vitro* частично связаны с развитием каллуса и отсутствием сосудистой связи корневой системы с побегом. Большая роль в укоренении побегов *in vitro* отводится витаминам. Укоренение подвоя персика Nemaguard сократилось с 90 до 25 %, если в питательной среде использовали рецептуру витаминов

Staba и проходило успешно в опытах со сливой и черешней. Отрицательное действие рибофлавина в процессе укоренения айвы полностью устранялось, если свет отсутствовал на начальных этапах укоренения. Возможно, положительное влияние отсутствия витаминов в питательной среде связано с сохранением ювенильных характеристик тканей, что было показано в опытах с виноградом.

Вместе с тем очень важно создать условия, обеспечивающие не только укоренение, но и рост побегов *in vitro* и *in vivo*, что позволяет увеличить процент приживаемости растений *in vivo*. Способность к росту побегов зависела от сорта и гормонального состава питательной среды укоренения, а также от способа обработки регуляторами роста.

Большинство авторов отмечают ингибирование в развитии корней и надземной системы при длительном их воздействии. Непродолжительное воздействие (5–13 дней) ауксинами, с последующим их выращиванием на питательной среде без регуляторов роста увеличивало укоренение многих культур.

В опытах с подвоями черешни оптимальный срок нахождения побегов на питательной среде с ИМК был равен двум дням. Не удивительно, что ряд авторов рекомендует использовать методику обработки, применяемую при зеленом черенковании с самым быстрым развитием на питательной среде без регуляторов роста. Такой способ был успешно применен в опытах с камелией японской и другими культурами. Развитие каллуса отсутствовало, а корни появились через две недели.

Укоренение *in vitro* многих культур зависит от условий, в которых проходил этап пролиферации побегов. Пригодные для укоренения побеги формируются только после длительного культивирования. Даже на 11–14-м пассаже укоренение трудно укореняемых видов растений представляет серьезную проблему.

Большая проблема размножения растений *in vitro*, – способность их выжить в нестерильных условиях. Ключ к ее решению –

развитие корневых волосков. Очень часто укорененные на агаровой или жидкой среде растения развивают корни, но у них отсутствуют корневые волоски, необходимые для поглощения воды и питательных элементов. Поэтому предложено использовать на этапе укоренения вместо агар-агара различные заменители. В опытах с яблоней испытания различных физических наполнителей (песок, торф, вермикулит, перлит, жидкая среда и их сочетание) показали, что укоренение побегов в песке было существенно выше по сравнению с другими наполнителями. Укоренение сортов роз лучше проходило при использовании песка и целлюлозы, ванили, коры ирги, торфа и перлита. В качестве заменителя агар-агара, для легко укореняемых видов, получены положительные результаты в опытах с полиуретаном и стекловолокном. Однако они требуют предварительной обработки для уменьшения токсичности.

Таким образом, укоренение побегов *in vivo* может быть альтернативой укоренения *in vitro*, но для этого необходимо разработать методику, обеспечивающую получение стабильных высоких результатов. Для некоторых культур (земляника) при таком способе укоренения отмечают побурение верхушки растений из-за локального дефицита кальция.

3.6. Адаптация растений, полученных *in vitro*

Для того чтобы растения прижились в нестерильных условиях, они должны быть готовы преодолеть стрессы, которым подвергаются в процессе адаптации. Стресс является результатом любого влияния, которое лимитирует нормальный рост и развитие. В момент пересадки растения, прежде всего, подвергаются водному стрессу, что приводит к обезвоживанию тканей и разрушению мембран. При воздействии низких положительных температур также происходит частичное обезвоживание тканей. Поэтому лучшая приживаемость растений в нестерильных условиях,

подвергнутых воздействию определенное время низкими температурами, возможно, связана с частичным повышением устойчивости к водному стрессу (рис. 10).

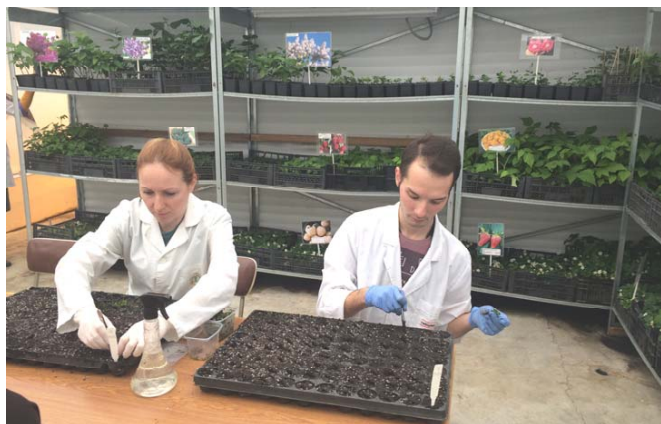


Рис. 10. Пересадка пробирочных растений в нестерильные условия

Несмотря на огромное количество опытов, промышленное клональное микроразмножение сталкивается с большими потерями при пересадке в нестерильные условия. Некоторые публикации отмечают более 50 % гибели на этом этапе.

Таким образом, промышленное применение клонального микроразмножения возможно только при условии успешного переноса растений в нестерильные условия (рис. 11, 12). Вследствие перечисленных выше физиологических расстройств у растений *in vitro* может возникнуть водный стресс, что задерживает рост или вызывает гибель растений. Особенно чувствительны растения к иссушению сразу после их удаления из сосудов. Причина иссушения связана с недостатком кутикулярного воска, с нефункционирующими устьицами, с сокращением поглощения воды корнями и сильной транспирацией. Уже после 40 мин нахождения пробирочных растений при относительной влажности воздуха 40 % отмечают потерю более 40 % воды листьями, а поврежденные клетки – в течение 15–30 мин.

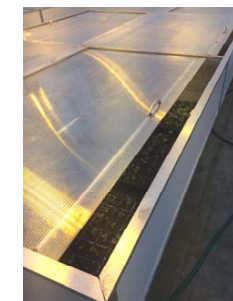


Рис. 11. Устройства для адаптации растений *in vivo*



Рис. 12. Адаптированные растения малины, пригодные для посадки в более крупные контейнеры

Для яблони и вишни даже влажность воздуха 95 % была недостаточной, чтобы предотвратить увядание листьев и гибель пробирочных растений. Потеря воды пробирочными растениями в основном происходит через устьица, которые не функционируют в течение 10–14 дней после пересадки. Причиной может быть длительное нахождение растений под влиянием цитокининов.

Однако не только водный обмен пробирочных растений является причиной их гибели в нестерильных условиях.

В условиях *in vitro* растения способны только к гетеротрофному питанию, поэтому на всех этапах клонального микроразмножения в питательные среды добавляют в основном сахарозу. После пересадки в нестерильные условия растения не могут полностью адаптироваться к фотоаутотропии, так как активность ферментов, фиксирующих углевод (карбоксилаза и др.) существенно уменьшается. Поэтому рекомендуют перед посадкой в нестерильные условия растения две недели выращивать при освещении 10000 лк. Листья пробирочных растений поглощают в 4–5 раз меньше CO_2 по сравнению с контрольными растениями.

Очень часто фотосинтез листьев, выращенных в условиях *in vitro*, был негативным, то есть не перекрывал потребности дыхания. У листьев растений, полученных *in vitro*, отмечают один слой палисадной паренхимы, а проводящая система жилок – в два раза меньше. Было показано, что новые листья, развившиеся при адаптации, частично способны к активному фотосинтезу.

Третий фактор, создающий проблемы при пересадке растений в нестерильные условия – недостаточно функционирующая корневая система, которая не в состоянии поглотить необходимое количество воды и питательных элементов, чтобы компенсировать транспирацию, обеспечить интенсивный рост. Корни растений, полученные *in vitro*, не имеют корневых волосков, часто они развиваются из каллуса.

Таким образом, адаптация – ключевой этап успешного размножения растений *in vitro*. Растения, выращенные в любых условиях, адаптированы к этим условиям. Растения, которые перемещаются в другие условия, должны либо адаптировать старые части растения к новым условиям, либо расти достаточно быстро, чтобы выросли новые. Желательно чтобы эти два процесса про-

исходили одновременно. Поэтому необходимы специальные меры предосторожности при пересадке пробирочных растений.

Развитие механизма закрытия устьиц является важным компонентом адаптации и может произойти при относительной влажности воздуха 65 %.

Однако при такой влажности происходит быстрая гибель растений. Поэтому большинство авторов рекомендуют определенное время поддерживать влажность воздуха в пределах 95–99 %, постепенно в течение 10–14 дней понижать влажность до 50–60 %. Высокая влажность воздуха может быть создана с помощью искусственного тумана, влажного тента, индивидуального пластикового покрытия, системы СМОГ. При небольших объемах пересадки влажный тент увеличивает приживаемость и силу роста по сравнению с туманом.

Искусственный туман позволяет контролировать и поддерживать влажность воздуха, но он способен вымыть питательные вещества из растения, переувлажнить субстрат, что приводит к серьезным грибным заболеваниям. Влажный тент создает высокую влажность, но трудно осуществлять контроль за температурой и необходимой влажностью на конкретном этапе. Пластиковые покрытия единичных растений требуют больших затрат ручного труда, для частого открытия и закрытия выращиваемых растений (рис. 13).



Рис. 13. Работа искусственного тумана

Система СМОГ идеальна для адаптации пробирочных растений, но очень дорогая. Учитывая важность адаптации, промышленные лаборатории идут на создание специальных камер, в которых регулируются все климатические параметры. Однако стоимость таких камер иногда превышает стоимость лаборатории *in vitro*. Адаптация пробирочных растений зависит от вида растений. Для некоторых травянистых растений, отличающихся интенсивным ростом после посадки в нестерильные условия (сингониум, гербера, некоторые овощные культуры), адаптация проходит успешно без контроля за влажностью. Чтобы увеличить процент приживаемости большинства видов растений (особенно древесных) необходимо начинать их готовить к новым условиям еще *in vitro*. Для этого практикуют открывать сосуды на несколько дней до посадки в нестерильные условия. Растения, адаптированные таким образом, проявляют признаки увядания через два часа после снятия покрытия. На поверхности питательной среды через 7 дней развивается грибная инфекция, которая приводит к гибели растений.

Влажность воздуха в сосуде можно понизить до 75 %, если уменьшить температуру основания сосуда по сравнению с температурой атмосферы сосуда. Увеличение интенсивности света и сокращение влажности в сосуде на этапе укоренения дает возможность изменить форму устьиц и их расположение на листе, что способствует увеличению приживаемости в нестерильных условиях.

Чтобы уменьшить влажность воздуха в пробирках, на питательную среду для укоренения наносят тонкий слой стерильной ланолиновой пасты, растительного масла, парафина. Эта методика позволяет снизить влажность воздуха до 70 %. Потеря воды листьями растений, выращенных в таких условиях, равнялась потерям влаги у растений, прижившихся в нестерильных условиях, однако опытные растения отличались слабым развитием (рис. 14).

Уменьшить потерю, воды при пересадке растений очевидно возможно, нанося на листья антитранспиранты.



Рис. 14. Новое направление адаптации непосредственно в культуральных сосудах

Существуют несколько типов антитранспирантов: закрывающие устьица, создающие пленку на поверхности листа, увеличивающие отражение света. Однако все они уменьшают фотосинтез растений, который у пробирочных растений слабо выражен. Положительные результаты в опыте с антитранспирантами отмечены только для быстро растущих в нестерильных условиях травянистых растений. Основная причина неудач от применения антитранспирантов – уменьшение фотосинтеза наряду с фитотоксичностью.

Кратковременная обработка укорененных растений яблони 0,2 % раствором мочевины и ИМК повышало приживаемость их в нестерильных условиях. Проблемы метаболизма кальция на этапе *in vitro* могут проявляться и при переносе растений в нестерильные условия. Поэтому опрыскивание растений раствором кальция в условиях высокой влажности позволяет компенсировать его дефицит, избежать отмирания верхушек побегов.

Желательно, чтобы ко времени переноса растений они имели листья с закрывающимися устьицами. Применение в питательной среде ингибиторов синтеза этилена (аминоизомаляевой кислоты, аминопропана, аминэтоксиванил глицина) улучшало качество

растений и приживаемость в нестерильных условиях. Развитие стекловидности у растений *in vitro* тесно связано с концентрациями и соотношением макро-, микроэлементов. Из 10 комбинаций макро- и микроэлементов стекловидность не развивалась на средах, содержащих $\frac{1}{4}$ макро- и 1 микроэлементов питательной среды по прописи MS. Стекловидность не развивалась, если в питательную среду вводили лецитин и глутатион. Воздействие на растения полиэтилен гликолем улучшало анатомическое строение листьев, способствовало развитию кутикулярного слоя, увеличивало проводимость ксилемы, водоудерживающую способность листьев, однако сокращало рост растений.

Растения, выросшие на среде с полиэтилен гликолем, не увядали при влажности воздуха 80 %. Однако в опытах с петунией применение полиэтилен гликоля не уменьшало количество стекловидных растений.

Для того чтобы свести к минимуму потери при пересадке пробирочных растений, необходим продолжительный период регулирования температуры и относительной влажности. Некоторые авторы рекомендуют уменьшать влажность на 5 % каждый день. Такая процедура возможна в эксперименте, однако трудно осуществима в промышленных масштабах. Но не только контроль за водным режимом растений *in vitro* является проблемой их выживания в нестерильных условиях. Слабый фотосинтез пробирочных растений не позволяет поддержать их рост в нестерильных условиях. Попытки укоренять растения *in vitro* на питательной среде без углеводов оказались безуспешными. Система *in vitro* создает условия, которые не встречаются при обычных способах выращивания. Недостаточный фотосинтез создает серьезный стресс растений в условиях *in vitro*. Состояние растений на период пересадки зависит от используемых углеводов, качества света и содержания в сосудах CO_2 . В настоящее время созданы установки, которые обеспечивают укоренение *in vitro* без сахарозы.

Было сделано предположение, что основная функция листьев, развившихся *in vitro* – временный источник минерального питания во время трудного периода после пересадки. Даже к концу адаптации фиксация углерода этими листьями (если они сохранились) была недостаточной. В опытах с клеточной культурой клетки, содержащие хлорофилл, были не способны поддерживать рост за счет фотосинтеза. Однако было установлено, что хлорофилл растений *in vitro* обладает способностью к фотосинтезу, но эта способность не реализуется из-за низкой концентрации CO_2 в сосудах и вследствие введения в питательную среду сахарозы. Увеличение содержания CO_2 в сосудах существенно повышало фотосинтетическую активность листьев пробирочных растений. Очевидно, что способность к фотоаутотрофии *in vitro* будет зависеть от типа покрытия сосудов, света, концентрации сахарозы.

Опыты с меченой сахарозой и CO_2 показали, что способность к фиксации углерода в большей мере выражено на этапе укоренения; 36 % аккумулированного углерода листьями у плотно закрытых и 95 % у слабо закрытых сосудов было результатом фотосинтеза. Плотное закрытие сосудов создает очень большие различия в содержании CO_2 ночью и днем (30 раз), слабое закрытие – только в 2–3 раза. Адаптация растений способных к фотосинтезу была более успешной при пересадке в нестерильные условия. Скорость появления новых листьев в нестерильных условиях зависит от степени развития вегетативных почек *in vitro* и положительно коррелирует с интенсивностью света в момент укоренения побегов.

Таким образом, общая задача последнего этапа клонального микроразмножения *in vitro* – увеличить количество продуктов фотосинтеза и ускорить образование новых листьев в нестерильных условиях, что, по-видимому, может сгладить водный стресс во время адаптации. Растения земляники успешно приживаются в нестерильных условиях, если на момент пересадки их площадь листьев была 30 см^2 , а сухая масса 0,3 г.

В литературе отмечено влияние типа покрытия на характер развития растений *in vitro*. Однако его эффект связан не только с концентрацией CO₂, но и, очевидно, с этиленом. В плотно закрытых сосудах отмечают его повышенное содержание. Удаление этилена на этапе пролиферации уменьшало коэффициент размножения, а на этапе укоренения подвоя персика GF/677 увеличивало укореняемость в 3 раза. Высокое содержание этилена и большой процент стекловидных растений отмечают при использовании покрытия Parafilm. Таким образом, покрытие должно обеспечивать достаточное содержание этилена на этапе пролиферации побегов и незначительное его количество на этапе укоренения.

Приживаемость растений в нестерильных условиях зависит от развития корневой системы. Процесс корнеобразования, морфология корней зависит от типа и концентрации ауксина и агарагара. Малые концентрации НУК по сравнению с ИМК и ИУК, увеличивают укореняемость роз *in vitro* и приживаемость в нестерильных условиях. Если побеги удастся укоренить без воздействия ауксином, то они приживаются в нестерильных условиях лучше. Микрочеренки растений, отличающиеся быстрым укоренением, можно укоренять непосредственно в субстрате. Положительные результаты отмечены для роз, рододендрона, березы только при использовании хорошо развитых побегов. Такой способ приемлем не для всех культур, так как отмечают гибель более 40 % микрочеренков. Корни, развившиеся на агаризованной питательной среде, имеют первичное строение, как правило, не ветвятся, слабо поглощают воду, элементы питания.

Использование на этапе укоренения пеларгонии целлюлозы, песка, торфа, перлита, вермикулита вместо агарагара показали важность субстрата. Чаще используют смесь торфа с песком.

Большой процент приживаемости отмечают при использовании 2 частей коры красного дерева и 1 части вермикулита. Установлено, что для пробирочных растений необходим субстрат с

объемом пор 25 %. Очень важно учитывать способность экзогенных регуляторов роста стимулировать репарационные процессы. Ауксин повышает устойчивость к засухе, гиббериллин к высокой температуре, цитокинины ко многим стрессам, но если у растения преобладают процессы деструкции, то те же регуляторы роста могут ускорить гибель растений. Большую роль в приживаемости растений в нестерильных условиях играет фитосанитарное состояние субстрата. Обогащение его микоризой увеличивало приживаемость и рост растений. Облучение субстрата более благоприятно для приживаемости растений по сравнению со стерилизацией теплом.

Таким образом, перенос растений, полученных *in vitro*, в нестерильные условия в настоящее время является одним из важнейших этапов в технологии клонального микроразмножения. Несмотря на достаточную изученность многих физиологических процессов до и после переноса растений, ответственных за приживаемость, мы не имеем простого технологического решения. Одни рекомендации сложны в использовании, другие требуют сложного технологического обеспечения. Например, камеры, в которых можно выращивать растения *in vitro* без закрытия сосудов.

В последнее время появились разработки, которые позволяют создавать дешевые домашние лаборатории по клональному микроразмножению. Конечно, они не предназначены для размножения трудноразмножаемых растений, но вполне могут обеспечить коммерческое производство ряда растений.

3.7. Методы длительного хранения *in vitro* растений в состоянии замедленного роста

Использование технологии клонального микроразмножения раскрывает широкие возможности для хранения ценных генетических коллекций.

В последнее десятилетие для сохранения генетических коллекций растений все чаще применяют культуры клеток и тканей. Кол-

лекции *in vitro* позволяют сохранять многие редкие и исчезающие растения, оздоровленные базисные клоны вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений, а также клоны растительного материала, являющиеся источниками генов в селекции. Это тем более важно, так как создание банка семян не решает проблемы сохранения вегетативно размножаемых хозяйственно-ценных растений.

В настоящее время, в лабораториях разных стран мира так сохраняют растения различных систематических групп, обладающих различной морфологией и физиологией. Например, в ГБС РАН создана и постоянно пополняется коллекция асептических культур растений, включающая более 600 различных генотипов. При этом большая часть коллекции хранится в состоянии замедленного роста. Уход за такими коллекциями подразумевает периодическую ревизию на наличие контаминации, оценку жизнеспособности микрорастений и проведение рекультивирования.

Институт растениеводства им. Н.И. Вавилова располагает коллекцией *in vitro* хозяйственно-ценных культур, в целом около 500 образцов (картофель, земляника, малина, ежевика, смородина, жимолость, вишня). Большая часть коллекции представлена сортами отечественной селекции.

К настоящему времени в источниках литературы изложен обширный экспериментальный материал по методикам сохранения и воспроизводства растений в условиях *in vitro* с подробным описанием большого количества приемов и методов. В конечном итоге все способы содержания коллекций *in vitro* можно разделить на две категории:

- пересадочные коллекции: хранение растительного материала происходит в условиях нормального роста;
- депонированные коллекции, растения находятся в состоянии замедленного роста.

Хранение в условиях нормального роста происходит в стандартных условиях для микроразмножения, при этом методе под-

держания ценных генотипов применяется своевременная пересадка на свежие питательные среды, обеспечивающая дальнейший рост микрорастений, что влечет за собой затраты и повышенную трудоемкость.

Частота генетических отклонений зависит от скорости клеточных делений, в связи с этим риск появления уклоняющихся форм может быть существенным на фоне постоянных пересадок микрорастений на свежую питательную среду. При постоянных пересадках растительного материала с одной питательной среды на другую может произойти множество негативных последствий: нарушение стерильности, потеря морфогенетического и регенерационного потенциала растений и их гибель. Чаще всего этот способ применяют для сезонного накопления микрорастений перед этапом массовой адаптации к условиям *ex vitro* в теплице.

Депонирование растительного материала *in vitro* является более ресурсосберегающим способом поддержания коллекций микрорастений, по причине увеличения интервала пересадок регенерантов.

Успешное депонирование плодовых и ягодных культур *in vitro* определяется в первую очередь целью длительного хранения, а также условиями культивирования и используемыми регуляторами роста. Основным подходом является моделирование таких условий и параметров культивирования, при которых понижается скорость обменных процессов и потребляется минимум питательных веществ, что позволяет микрорастениям находиться в состоянии покоя длительное время.

В большинстве случаев, способность растений к генетически стабильной регенерации значительно выше в культурах с замедленным ростом, поэтому разработка новых и совершенствование существующих методов хранения растений в состоянии замедленного роста является перспективным направлением для сохранения генофонда. Главный методический подход к депонированию растений *in vitro* – достижение состояния максимально за-

медленного метаболизма, поддерживающего жизнеспособность тканей экспланта.

Ещё в XX веке стали известны методы депонирования коллекций микрорастений ягодных и плодовых культур *in vitro*.

Существует множество способов депонирования культур тканей растений *in vitro*: глубокое замораживание до температуры жидкого азота ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), депонирование коллекции при пониженных положительных температурах подбором соответствующего состава газовой среды и спектрального состава света, изменение концентрации углеводов в среде, использование ретардантов, гипоксия и другие.

Лучшими условиями для депонирования микрорастений черной смородины *in vitro* являлись низкие положительные температуры в диапазоне $+2-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ на фоне пониженной освещенности и фотопериода 16 ч и добавление в питательную среду маннита, при этом опытные образцы сохраняли жизнеспособность на протяжении 1,5–2 лет. Так, микрорастения земляники сохраняли жизнеспособность в течение года на жидкой и агаризованной питательных средах на фоне низких положительных температур $+1-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ без освещения, лучшей способностью к регенерации жизнеспособными отличались микрорастения на жидкой питательной среде.

Интересен способ сокращения испарения воды из питательной среды при помощи полиэтиленовых пакетов или пленки. Помещение в полиэтиленовые пакеты и дальнейшее хранение при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ без досветки способствовало сохранению 50 % микрорастений земляники после 15 месяцев хранения. Упакованные пробирки с регенерантами хранятся в бытовом холодильнике при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до 220 дней.

Перспективен метод криоконсервации, он же замораживание до температуры жидкого азота, однако в полной мере он реализуется в лабораториях, которые имеют значительное финансирование.

Некоторые из них позволяют сохранять растения земляники более двух лет без смены питательной среды. Однако с помощью

криогенного замораживания продолжительность сохранения жизнеспособного растительного материала может быть увеличена многократно. Так, в Институте физиологии растений РАН (ИФР РАН) растения земляники садовой были восстановлены из меристем, которые сохраняли в жидком азоте более десяти лет.

Замедляют рост и такие приемы, как снижение атмосферного давления (до 0,5 мм рт.ст.) и изменение газового состава внутри культурального сосуда (кислородное голодание при применении газовой смеси 90 % азота и 10 % кислорода). Для уменьшения испарения воды из питательной среды можно использовать на поверхности слой минерального масла.

Широко применяется способ добавления в питательные среды для замедления роста микрорастений *in vitro* органических веществ обладающих осмотической активностью, таких как манит или сорбит, или гормональной, например абсцизовая кислота (АБК).

Известен способ применения в составе питательных сред ретардантов (абсцизовая кислота, ССС, гидразид малеиновой кислоты и другие). Абсцизовая кислота является активным эндогенным ингибитором роста, а также антистрессовым фактором, который активизирует адаптогенные свойства растений к неблагоприятным условиям. Известно, что добавление в состав питательной среды АБК останавливает рост культуры *in vitro*, при этом не снижает жизнеспособность микрорастений.

Чаще всего применяют такие методы как изменение светового режима, охлаждение до температуры остановки активного роста и изменение состава питательной среды, а также их комбинирование, поскольку они наиболее просты и универсальны.

Остальные более трудоемкие методы депонирования растений в культуре *in vitro* применяются редко. Публикации на тему длительного хранения микрорастений в настоящее время все еще не немногочисленны. Поиск веществ, одновременно замедляющих рост растений и поддерживающих их жизнеспособность дли-

тельный период времени, отработка способов их применения, всегда будут востребованы.

По экспериментальным данным ведение маннита и сорбита позволило сохранить жизнеспособность большинства сортов голубики высокой и одного сорта брусники обыкновенной в течение длительного субкультивирования (4 месяца) без пересадок. Использование в составе питательной среды АБК обеспечило поддержание растений картофеля в течение года при сохранении 80 % регенерационной способности микрорастений. Введение в состав модифицированной питательной среды MS (хлорида кальция заменен на нитрат кальция) маннита способствовало увеличению продолжительности жизни микрорастений земляники на протяжении пассажа. При 16-часовом фотопериоде, освещенности 5–8 клк и диапазоне температур 25–28 °С более 50 % опытных микрорастений сохраняли жизнеспособность в течение 8 месяцев, а при 2–4 °С, 4-часовом дне и освещенности 0,5–0,8 клк – жизнеспособными являлись более 60 % микрорастений на протяжении 24 месяцев.

Эффект замедленного метаболизма микрорастений можно достигнуть комбинацией пониженной температуры и применения ингибитора роста. Например, различные сорта розы, клематиса, орхидеи, фейхоа, киви, алычи, сливы и абрикоса хранили на половинной среде MS с добавлением ретарданта хлорхолинхлорида (ССС) 0,2–0,4 г/л в течение двух лет без потери жизнеспособности 90–100 % эксплантов. Длительность хранения микрорастений винограда увеличивается до шести месяцев при добавлении в питательную среду 1 мг/л (ССС) на фоне низких положительных температур (5–12 °С) и освещенности (500 лк). Однако встречаются данные, что применение питательных сред содержащих ретардант ССС приводит к физиологическим расстройствам, снижает регенерационный потенциал на последующих этапах микро-размножения, и может приводить к генетическим нарушениям. Для остановки активного роста возможно применение естествен-

ных ингибиторов ростовых процессов в коллекциях *in vitro*. Например, добавление в питательную среду тонко размолотых семян винограда (1 % порошок и 20 % вытяжка тонко размолотых семян), позволяет увеличить интервалы между пассажами микрорастений на свежую питательную среду до 10 месяцев.

В опытах А.И. Мохаммеда при субкультивировании *in vitro* микрорастений малины красной на питательной среде MS без регуляторов роста при пониженной температуре (+2 °С) и слабом освещении привело к задержке активного роста, медленному потреблению питательных веществ и сохранению жизнеспособности около 60 % растений в течение 12 месяцев. А наилучшее сохранение жизнеспособности микрорастений (71–100 %) в течение 12 месяцев в условиях пониженной температуры и освещенности отмечалось на модифицированной среде MS, содержащей $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (780 мг/л) и увеличенной вдвое концентрацией K_2HPO_4 , на фоне 6-БАП(1 мг/л). Отмечается также, что возвращение растений в стандартные условия (+25 °С) способствовало восстановлению их ростовых процессов, а при пересадке на свежую питательную среду микрорастения формировали дополнительные побеги, не имеющие морфологических отклонений, по 9,4–12,2 шт. в зависимости от сорта, когда до хранения этот показатель не превышал 5,4–8,5 шт. В исследованиях И.В. Митрофановой описан эффект повышения регенерационного потенциала микрорастений после длительного хранения и дальнейшем субкультивировании в стандартных условиях на примере эксплантов клематиса, розы, юкки, фейхоа и сливы.

Еще одним способом, замедляющим рост микрорастений является изменение минеральной основы питательной среды. При этом удаляют совсем или снижают концентрацию питательных элементов, ответственных за активный рост, что приводит к торможению ростовых процессов.

Из исследований известно, что депонирование укорененных микрорастений при пониженной температуре в различных услови-

ях освещенности оказывает прямое влияние и на их адаптацию к нестерильным условиям *ex vitro*, например подвой яблони 76-6-13 и груши ПГ12, сорта яблони Лобо, Лигол и груши Январская при депонировании в течение 3 месяцев наблюдалось увеличение приживаемости микрорастений на 7,7–31,9 %, в то время как у других опытных генотипов наблюдалось некоторое снижение показателя приживаемости.

В опытах О.Н. Высоцкой по хранению коллекции земляники статистический анализ показал, что маннит в концентрации 4 г/л оказывал положительное влияние на жизнеспособность микрорастений земляники. Однако в опытах с малиной красной добавление в питательную среду манита (4 г/л) привело к снижению жизнеспособности микрорастений.

Предложен малозатратный способ хранения микрорастений осины с использованием питательной среды WPM, содержащей сахарозу (10–20 г/л) сорбитол (5–10 г/л), маннитол (5–10 г/л), агар-агар (9 г/л) и витамины по MS 1 мл/л. Вначале, субкультивирование микрорастений при интенсивном режиме освещения (5000 лк, 16 ч день / 8 ч ночь) при температуре +22 °С проводят в течение 2 недель, затем микрорастения переносят в условия хранения на +4 °С на фоне пониженного освещения (примерно 2000 лк) и режиме короткого дня (8 ч день / 16 ч ночь). Таким образом, применение в составе питательной среды осмотически активных веществ и подбор оптимального фотопериода во время депонирования способствуют постепенному переходу растений в состояние покоя, что позволяет сохранять их жизнеспособность в течение года.

Существует ряд требований, которым в идеале должен соответствовать разработанный способ длительного хранения:

- минимальный уход за коллекцией на протяжении депонирования;
- сохранение регенерационного потенциала и последующая его реализация получением растений-регенерантов;

- возможность международного обмена;
- экономическая целесообразность хранения;
- поддержание удовлетворительного уровня генетической стабильности.

В целом, все из перечисленных выше способов поддержания коллекций микрорастений в асептических условиях имеют свои недостатки. При использовании культуры *in vitro* для сохранения ценных генотипов возникает ряд проблем, обусловленных спецификой технологии клонального микроразмножения.

Одним из лимитирующих факторов при поддержании коллекции микрорастений в состоянии активного роста является ограниченный объем питательной среды, котором с течением времени происходит истощение питательных веществ и накопление токсичных продуктов обмена веществ, что в свою очередь, негативно сказывается на состоянии растений и приводит к потере их жизнеспособности. Примером может служить витрификация или «гиперпроводнение» (заполнение водой межклеточного пространства), при которой микрорастения некротизируются и погибают. В связи с этим, во избежание потери генотипа, необходимо постоянное последовательное пассирование микрорастений на новые питательные среды.

Депонирование коллекций микрорастений в состоянии замедленного роста также имеет свои трудности – данный способ позволяет увеличить интервалы между пассажами, и не отменяет их, и в целом, не решает радикально проблему длительного сохранения микрорастений. Во время пересадки может нарушиться стерильность в следствие нарушение техники асептических работ, нарушение ламинарного потока воздуха в момент микрочеренкования возникает риск занесения грибной и бактериальной инфекции в культуральные сосуды. Чаще всего споры грибов прорастают в течение 5–7 дней, а бактериальная инфекция часто не успевает образовать колонии на питательной среде и остается неза-

меченной. Бактериальная инфекция, находящаяся в проводящей системе микрорастений, находится в латентном состоянии и зараженные экземпляры внешне никак не отличаются.

Известно, что при изменении условий субкультивирования после длительного хранения, отмечается факт появления бактериальной инфекции из проводящей системы микрорастений при пересадке на свежие питательные среды.

Неограниченно долго растительный материал может храниться только с помощью криосохранения, так как клеточные деления не происходят, и таким образом, сдерживается появление генетических отклонений. Воспроизведение сохраняемых образцов требует строгого соблюдения всех этапов технологии криоконсервации. Множество современных способов криоконсервации позволяет успешно сохранять многие виды растений, однако в связи с трудоемкостью, необходимостью применения дорогого оборудования и реактивов, применение криосохранения все же ограничено.

3.8. Размножение растений искусственными семенами

Технология клонального микроразмножения растений требует больших затрат ручного труда. Попытки роботизировать основные этапы размножения не дали положительных результатов. Поэтому в настоящее время ведутся поиски методов биотехнологии способных существенно увеличить эффективность вегетативного размножения. Таким методом может быть особый раздел биотехнологии – соматический эмбриогенез, многообещающая технология размножения, предусматривающая получение искусственных семян (рис. 15). Все этапы получения искусственных семян поддаются автоматизации и тем самым позволяют поднять процесс вегетативного размножения на новую ступень. Процесс развития соматических зародышей проходит в биореакторах. Все этапы его развития поддаются контролю и визуальному наблюдению на компьютере.

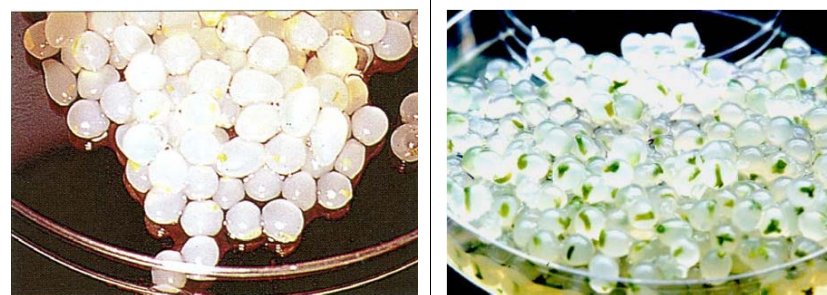


Рис. 15. Искусственные семена и их проращивание

Для многих культур, отличающихся высокой регенерационной способностью, в биореакторе развивалось в день 50 шт. зародышей в 1 см³ среды. В настоящее время получены искусственные семена различных культур (хвойные, лиственные, пальма, орхидеи). Новая технология размножения имеет еще много технических и биологических проблем. Одна из них – недостаточное количество развивающихся зародышей и различия в их развитии. Производство соматических зародышей включает три стадии: индукция, поддержание эмбриогенной культуры, развитие зародышей. Успешное их прохождение зависит от состава среды, условий выращивания, типа экспланта.

Размножению растений в биореакторе предшествует установление оптимального типа тканей и состава питательной среды. Соматический эмбриогенез может развиваться через каллусную культуру либо может быть получен без стадии каллусообразования на поверхности неэмбриогенной ткани. Выход соматических зародышей зависит от способности проэмбриогенных клеток развиваться в соматические зародыши. Количество таких клеток в суспензионной культуре является критерием эмбриогенетического потенциала. У древесных растений пролиферирующие зародыши отпочковываются от взрослых зародышей. Желательно использовать ткани, у которых вероятность содержания вирусов сведена к минимуму.

Глава 4. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ САДОВЫХ РАСТЕНИЙ

4.1. Организация работы и оборудование

Лаборатория клонального микроразмножения представляет собой комплекс помещений, изолированных от окружающей среды, что необходимо для реализации работ со стерильными культурами тканей растений и включает:

1. Операционную комнату, представляющую собой отдельное помещение с легко моющимися поверхностями стен и пола, оснащенную ультрафиолетовой лампой, ламинарным боксом с биноккулярной лупой и гасперленовым стерилизатором, столом и шкафами для хранения стерильных питательных сред, материалов (рис. 16).



Рис. 16. Общий вид операционной комнаты

2. Комнату для приготовления питательных сред, оснащенную аквадистиллятором, лабораторной нагревательной плиткой, СВЧ-печью, магнитной и механической мешалками, рН-метром, аналитическими весами, ручным диспенсером, сухожаровыми шкафами для стерилизации лабораторной посуды и металлизации лабораторной посуды и металлизации инструментов, шкафами для хранения реактивов и

лабораторной посуды, вытяжным шкафом, холодильником, местом для мытья лабораторной посуды (рис. 17, 18).



Рис. 17. Комната для приготовления питательной среды



Рис. 18. Место для мытья лабораторной посуды

3. Стерилизационную комнату, оснащенную минимум двумя автоклавами (рис. 19).

5. Культуральную комнату, оборудованную светостеллажами (освещенность в диапазоне 400–10000 лк), минимум двумя кондиционерами с зимними комплектами для поддержания температуры в пределах +20–28 °С и программным реле времени для поддержания 16-часового фотопериода (рис. 20).

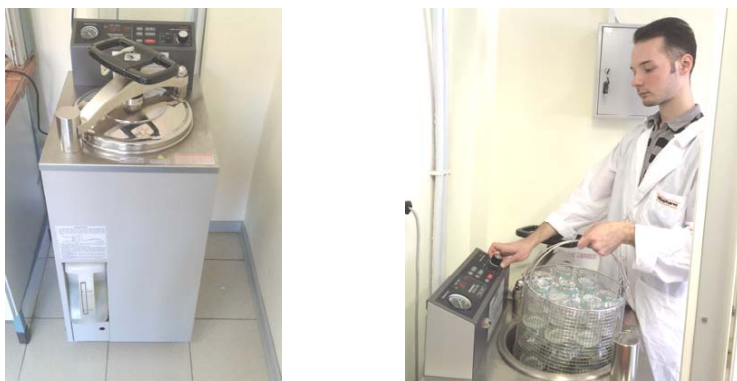


Рис. 19. Общий вид автоклава и процесс разгрузки стерилизационной камеры



Рис. 20. Культуральная комната с контролируемыми условиями

6. Адаптационную теплицу для перевода полученных в лаборатории растений-регенерантов в нестерильные условия (рис. 21).



Рис. 21. Теплица для адаптации и доращивания *ex vitro* растений

4.2. Приготовление питательных сред

Физический и химический состав питательной среды должен обеспечить поступление воды и ионов в эксплант, поэтому питательная среда заменяет экспланту стебель, взрослые листья и корни.

Компоненты питательной среды для выращивания микрорастений можно разделить на 6 основных групп, что обычно отражает порядок приготовления концентрированных маточных растворов: макроэлементы, микроэлементы, источник железа, витамины, источник углерода, регуляторы роста.

Основой всех питательных сред для культивирования микрорастений являются растворы минеральных солей по прописям Murashige and Skoog, WPM, DKW, Quorina-Lepouvre, Кноп и др., которые в свою очередь были созданы на основе вегетационных опытов, изучающих питание в водных и песчаных культурах для выращивания различных растений.

Это соединения азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора – в виде фосфатов; серы – в виде сульфатов; а также растворимые соли K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Железо используется в хелатной форме (например, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ + этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) или её натриевая соль Na_2 ЭДТА или трилон Б) – в наиболее доступной форме для усвоения растительными тканями.

Чаще всего для инициации культуры *in vitro*, дальнейшей мультипликации и ризогенеза используют питательную среду Murashige and Skoog (MS) а также ее варианты с редуцированием и концентрированием по содержанию макроэлементов, углеводов и прочих элементов питания.

Применяют следующие маточные растворы:

- раствор макроэлементов;
- раствор микроэлементов;
- раствор хелатного железа;
- раствор хлористого кальция;

- растворы синтетических гормонов и витаминов.

Для искусственных питательных сред растворы макро- и микросолей готовят заранее и используют многократно. Эти маточные (концентрированные) растворы хранят в специальных условиях в холодильнике в стеклянных сосудах с притертыми пробками при температуре 0–4 °С.

Маточные растворы микросолей обычно превосходят рабочие по концентрации в 20 или 100 раз, микросолей – в 200 или 1000 раз.

Для приготовления маточного раствора макро- и микросолей каждую соль растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, затем смешивают и доводят до нужного объема. В охлажденную смесь микроэлементов последним добавляют раствор солей молибдена ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), а в макроэлементы – раствор солей магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) для предотвращения выпадения осадка.

Маточные растворы хелата железа и хлористого кальция готовят и хранят отдельно от других солей. Нарушение правильной методики приготовления хелатного железа может привести к выпадению в осадок фосфатов кальция и магния после автоклавирования (рис. 22, табл. 2).



Рис. 22. Приготовление питательной среды

Таблица 2

Методика расчета концентрации минеральных компонентов по прописи Murashige и Skoog для приготовления маточных растворов объемом 500 или 1000 мл различной концентрации

Минеральные соли	По прописи MS, мг/л	Маточный раствор, увеличенный в 200 раз		Маточный раствор, увеличенный в 1000 раз	
		мг/л	г/1000 мл	мг/л	г/1000 мл
H_3BO_3	6,2	1,24	0,62	6200	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	4,46	2,23	22300	22,3
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,005	0,0025	25	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,005	0,0025	25	0,025
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	1,72	0,86	8600	8,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^*$	0,25	0,05	0,025	250	0,25
KJ	0,83	0,166	0,083	830	0,83
Макроэлементы					
		Для приготовления 1 л питательной среды берем 5 мл		Для приготовления 1 л питательной среды берем 1 мл	
		г/1000 мл	г/500 мл	мг/л	г/1000 мл
NH_4NO_3	1650	33	16,5	165000	165
KNO_3	1900	38	19	190000	190
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$	370	7,4	3,7	37000	37
KH_2PO_4	170	3,4	1,7	17000	17
Макроэлементы					
		Маточный раствор, увеличенный в 20 раз		Маточный раствор, увеличенный в 100 раз	
		Для приготовления 1 л питательной среды берем 50 мл		Для приготовления 1 л питательной среды берем 10 мл	
NH_4NO_3	1650	33000	165000	165	82,5
KNO_3	1900	38000	190000	190	95
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$	370	7400	37000	37	18,5
KH_2PO_4	170	3400	17000	17	8,5

Минеральные соли	По прописи MS, мг/л	Маточный раствор, увеличенный в 200 раз	Маточный раствор, увеличенный в 1000 раз
Кальций			
		Маточный раствор, увеличенный в 20 раз Для приготовления 1 л питательной среды берем 50 мл	Маточный раствор, увеличенный в 100 раз Для приготовления 1 л питательной среды берем 1 мл
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	8800	44000
		8,8	44
		4,4	22
Железо			
		Маточный раствор, увеличенный в 200 раз Для приготовления 1 л питательной среды берем 5 мл	Маточный раствор, увеличенный в 1000 раз Для приготовления 1 л питательной среды берем 1 мл
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	5560	27800
EDTA трилон Б	37,3	7460	37300
		2,78	27,8
		3,73	37,3
			13,9
			18,65

* Добавлять в маточный раствор только после полного остывания растворов.

Витамины и фитогормоны хранят в холодильнике или лучше в морозильной камере при температуре –20 °С в небольших по 1–5 мл сосудах с плотно закрывающимися крышками.

Для стимулирования биохимических реакций в культивируемых тканях применяют витамины группы В (В1, В6, В12), С (аскорбиновая кислота), РР (никотиновая кислота), и мезоинозит. Концентрированные растворы витаминов готовят каждый отдельно путем растворения соответствующих навесок в дистиллированной воде (1 мл содержит 1 мг витамина).

Для управления процессами формообразования применяют синтетические вещества с цитокининовой активностью: кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП), зеатин, 6-диметилпиридинамин (2-ипа) в диапазоне концентраций 0,001–5 мг/л.

В качестве ауксинов в питательных средах используют индолмасляную кислоту (ИМК) и индолилуксусную кислоту (ИУК) – в концентрациях 0,1–1 мг/л, реже применяют нафтилуксусную кислоту (НУК).

Отдельные питательные среды включают гибберелловую кислоту (ГК). Присутствие ГК в среде не является обязательным, но в некоторых случаях она стимулирует рост растяжением микропобегов.

Фитогормоны, как правило, плохо растворяются в воде. Поэтому предварительно 10 мг вещества растворяют в небольших количествах (0,5–1 мл) спирта (ауксины, гиббереллины), 0,5–1 мл 0,1 н HCl или KOH (цитокинины), затем доводят до 10 мл объема (1 мл содержит 1 мг гормона). После приготовления в холодильной камере их можно хранить при температуре 4 °С не более 1 мес.

В качестве источника углерода в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 15–30 г/л. Обычно это дисахариды (сахароза) либо моносахариды (глюкоза, фруктоза, ксилоза и др.). Также применяют углеводы, которые не несут питательной ценно-

сти, зато обладают осмотической активностью (маннит, сорбит) для замедления роста микрорастений с целью длительного хранения.

Для культивирования микрорастений применяют жидкие и агаризованные (твердые) среды. Агаризованные среды готовят на основе агар-агара – полисахарида, входящего в состав морских водорослей, который образует с водой гель при pH 5,6–6,0. Обычно к среде добавляют 0,6–0,8 % агар-агара. В качестве уплотнителя и заменителя агар-агара используют полиакриламидные гели (биогели). Также возможно использование крахмала – пшеничного, картофельного, кукурузного – в концентрации 70 г/л.

Протокол приготовления питательной среды:

1. Для приготовления 1 л питательной среды сначала делают навески сахарозы, агар-агара и мезоинозитола.

2. Параллельно на лабораторной плитке или в СВЧ печи в огнеупорном мерном стакане разогревают дистиллированную воду объемом около 800 мл, доводя ее практически до кипения.

3. В мерный цилиндр или мерную колбу объемом 1 л наливают дистиллированной водой примерно 200 мл и добавляют необходимые количества маточных растворов макросолей, микросолей, глицина, витаминов и гормонов.

4. В подготовленной заранее горячей дистиллированной воде растворяют сахарозу и добавляют ее в мерный цилиндр с растворами солей.

5. Далее в огнеупорный мерный стакан высыпают агар-агар и заливают его небольшим количеством холодной дистиллированной воды и перемешивают. Затем добавляют заранее приготовленную горячую дистиллированную воду и растворяют агар-агар на лабораторной плитке или в СВЧ-печи, доводя до кипения. При этом важно следить, что в момент кипения агар-агар не переливался через стенки мерного стакана.

6. Далее расплавленный агар-агар добавляют в мерный цилиндр или мерную колбу, с предварительно добавленными рас-

творами макросолей, микросолей, глицина, витаминов, гормонов и сахарозы. И горячей дистиллированной водой доводят объем до 1000 мл.

7. Измеряют pH раствора и с помощью 0,1 н КОН или HCl доводят его до уровня 5,7–5,8.

8. Разливают среду по культуральным сосудам объемом 200 мл порциями по 30 мл. И подвергают стерилизации в автоклаве при температуре 120 °С и давлении 0,1 мПа и в течение 20 мин.

4.3. Техника асептической работы в ламинарном боксе

Одним из условий успешного культивирования микрорастений является соблюдение строгой асептики, поэтому все работы проводят в ламинарных боксах. Так как на искусственных питательных средах, обогащенных углеводами и витаминами, хорошо развиваются микроорганизмы, что представляет тройную опасность. Во-первых, в результате метаболизма микроорганизмов может существенно измениться состав питательных сред, во-вторых, микрорастения легко повреждаются микроорганизмами, а в-третьих, возникает опасность инфицирования всей коллекции стерильных микрорастений. Перед началом работ стерилизации подвергаются внутренние поверхности ламинарного бокса, инструменты, посуда, материалы и питательные среды (рис. 23, 24).

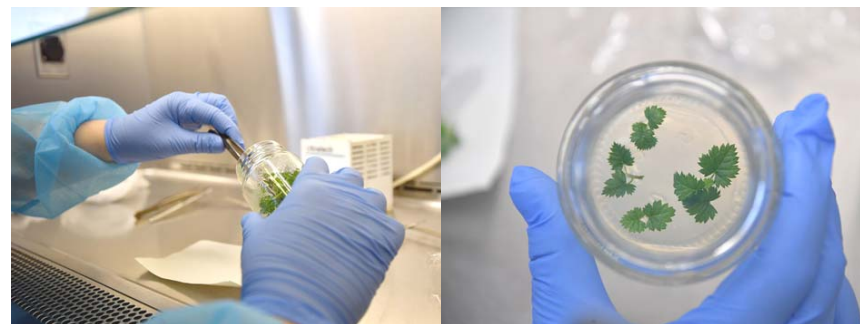


Рис. 23. Работа в ламинарном боксе



Рис. 24. Микрочеренки клонового подвоя яблони 54-118 на питательной среде после 40 дней субкультивирования

Ламинарные боксы располагают в отдельных изолированных помещениях – операционных комнатах, оборудованных ультрафиолетовыми лампами (УФ), стерилизаторами воздуха и вентиляцией. Установка нескольких ламинарных боксов друг против друга недопустима, по причине появления возможных турбулентных эффектов и снижения защитных свойств. Стерильность в ламинарном боксе достигается благодаря продуву воздуха через систему префильтров и НЕРА-фильтров тонкой очистки воздуха, и подаче в рабочую зону равномерного однонаправленного ниспадающего потока обеспыленного стерильного воздуха, что обеспечивает отсутствие перекрестной контаминации.

Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и т.д.) заключается в нагревании сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 140–180 °С. Металлические предметы нельзя стерилизовать в автоклаве, так как под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в ее процессе инструменты (пинцеты, скальпели, иглы) еще раз стерилизуют уже в ламинарном боксе, помещая их в мерный стакан с 96%-м этиловым спиртом и обжигая в стерилизаторе. Стерильный инструмент

используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным применением его следует снова обработать спиртом и обжечь в стерилизаторе.

Следует особенно тщательно соблюдать правила техники безопасности при использовании для стерилизации инструментов спиртовых горелок и всегда держать при себе колбу с дистиллированной водой и чистое хлопчатобумажное полотенце, так как нередко случаи пожаров и производственных травм в результате возгорания разлитого в ламинарном боксе спирта.

При выборе стерилизатора для ламинарного бокса следует отдавать предпочтение гласперленовым стерилизаторам с автоматическим поддержанием рабочей температуры в стерилизационной камере в течение всего дня и информированием о готовности прибора с помощью светового индикатора. Также допустимо использовать инфракрасные стерилизаторы.

За 20 мин до начала работы операционную комнату, и внутренний объем ламинарного бокса облучают УФ-лампами. Предварительно в ламинарном боксе размещают инструменты, мерный стакан с 96%-м спиртом объемом до 50 мл, включают стерилизатор (гласперленовый или инфракрасный).

Через 20 мин выключают УФ, включают двигатель ламинарного бокса и во избежание вредного влияния озона в течение минимум 30 мин проветривают помещение. Для работы в ламинарном боксе надевают одноразовый стерильный халат, который предназначен только для работы в операционной комнате, руки обрабатывают 70%-м спиртом.

Перед началом работы необходимо протереть рабочую поверхность ламинарного бокса 70%-м раствором спирта. Далее внутрь бокса помещают банки, колбы и пробирки с питательной средой, и культуральные сосуды с микрорастениями которые также предварительно обрабатывают 70%-м спиртом из пульверизатора и протирают.

При работе со стерильными культурами и посудой необходимо четко соблюдать правила асептической работы. Недопустимо проносить руки над открытой стерильной поверхностью культуральных сосудов, касаться руками стерильных материалов и эксплантов. В случае касания стерильным инструментом поверхности стола ламинарного бокса или материалов необходимо провести повторную стерилизацию инструментов. В случае падения микрочеренков со стерильной поверхности на стол ламинарного бокса их не следует использовать для дальнейшего размножения.

Также не допускается сильно загромождать рабочее пространство ламинарного бокса материалами, во избежание появления турбулентных эффектов в рабочей камере и последующей перекрестной контаминации.

4.4. Создание коллекции асептических культур *in vitro*

4.4.1. Этап введения в культуру *in vitro*

Для введения в культуру *in vitro*, дальнейшей мультипликации и ризогенеза используют питательные среды Murashige and Skoog, WPM, DKW, Quorina-Lerouvre, Кпор и др. Применяют исходные маточные растворы макроэлементов, микроэлементов, хелатного железа, витаминов, аминокислот и регуляторов роста, pH среды доводят до 5,8. Питательная среда, предварительно разлитая по культуральным сосудам, подвергается стерилизации в автоклаве при температуре 120 °С и давлении 0,1 мПа в течение 20 мин.

Для введения в культуру *in vitro* используют культуральные пробирки объёмом 15 мл (22×150 мм) с колпачками из фольги или пластиковыми крышками.

На этапах мультипликации и ризогенеза в качестве культуральных сосудов используют стеклянные банки с прозрачными крышками объёмом 200 мл. Возможно использование в качестве культуральных сосудов пластиковых пищевых контейнеров с крышками.

В качестве маточных растений используют активно растущие апикальные побеги длиной в 3–5 см в количестве не менее 20 на сорт. Их помещают в чистые полиэтиленовые пакеты и оперативно передают в лабораторию. Черенки промывают в течение 30 мин под проточной водой с последующим непрерывным перемешиванием в течение 15 мин в растворе фунгицида Фундазол 1 г/л.

Стерилизацию проводили в асептических условиях ламинарного бокса сначала спиртом (70 %) в течение 1–2 с, затем раствором гипохлорита натрия (содержание активного хлора 3 %) с добавлением анионных ПАВ 5 % в разведении 11 мл на 100 мл раствора в течение 10–15 мин. Последующее удаление стерилизующего агента с поверхности эксплантов проводили трехкратно, промывая экспланты в стерильной воде.

Далее в ламинарном боксе под бинокулярной лупой проводят вычленение меристематических апексов и помещают их в пробирки на поверхность питательной среды.

Перед выделением меристематических верхушек под микроскопом, верхушки побегов располагают на стерильной фильтровальной бумаге, лежащей на предметном столике микроскопа основанием отрезанного побега к оператору. Удаление зачаточных листьев делают с помощью глазного скальпеля или анатомической иглы вначале при увеличении 1 – 0,6. Иглой оператор придерживает основание отрезка побега, скальпелем отсекает зачаточные листочки. Чтобы точно определять основание отрезаемого листа, необходимо иглой зафиксировать основание побега, а скальпелем отодвинуть верхушку листьев немного вправо. Такая операция позволяет точно определить основание отделяемого листа, удалить его без повреждения конуса нарастания. После удаления листа, отрезок побега иглой поворачивается немного влево. Удаляется следующий зачаточный лист. В зависимости от культуры и количества удаленных листьев в нестерильных условиях, такую операцию приходится повторить 5–7 раз. По мере

удаления зачаточных листьев можно обнаружить не поврежденные боковые меристемы. Их можно также использовать для культивирования. Следует отметить, что боковые меристемы начинают расти несколько позже, по сравнению с апикальными меристематическими верхушками. Удаление последних 2–3 кроющих листочков необходимо проводить под 2-кратным увеличением.

После удаления последнего кроющего листа, под микроскопом можно увидеть хорошо различимый меристематический купол. Его величина зависит от времени года и колеблется от 50–150 мк. Его отличие от других частей меристематической верхушки – светло-зеленая окраска и зеркальный блеск. Отделенная меристематическая верхушка должна состоять из меристематического купола высотой 100–150 мк, одного, двух зачаточных листьев, один из которых как бы окутывает меристематический купол и субапикальной меристемы. Высота субапикальной меристемы не должна превышать 10–20 мк. Ее наличие необходимо, так как только один меристематический купол не способен регенерировать побег.

После отделения меристематической верхушки ее скальпелем помещают на кончик иглы таким образом, чтобы не нарушить полярность при посадке на питательную среду. Всю операцию необходимо проводить быстро, с тем, чтобы меристематическая верхушка не потеряла тургор, но при этом скальпелем необходимо делать срезы, а не разламывать ткани, что усиливает окислительные процессы и может быть причиной плохой регенерации.

После посадки меристематической верхушки, предметный столик покрывается новой стерильной фильтровальной бумагой, иглу и скальпель стерилизуют в спирте и обжигают на спиртовке, выдерживают некоторое время, чтобы инструмент остыл и операцию повторяют. Оптимальным считается выделение и посадка на питательную среду 30–50 меристематических верхушек в час (рис. 25, 26).



Рис. 25. Ламинарный бокс, оборудованный бинокулярной лупой для выделения апикальных меристем

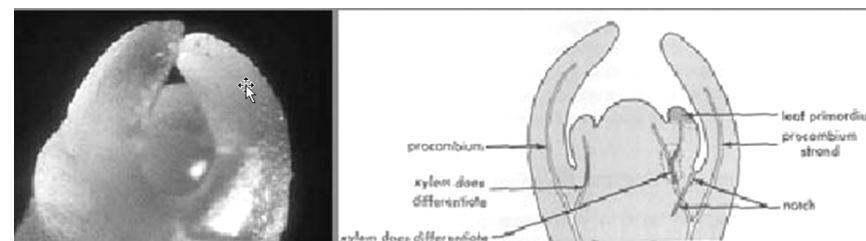


Рис 26. Внешний вид меристематического апекса

4.4.2. Этап мультипликации микропобегов

Основной задачей этого этапа является получение максимального количества микрорастений идентичных исходному маточному растению.

Существуют различные способы увеличения числа побегов на данном этапе. Наиболее простой заключается в росте побега в длину в результате развития апикальной меристемы с последующим делением побега на микрочеренки, несущие пазушные почки.

Другой путь – развитие побегов из пазушных почек в результате снятия эффекта апикального доминирования под действием цитокининов. В этом случае из экспланта за 4–8 недель развивается пучок (кластер) побегов. После разделения пучка миниатюрных побегов и посадки их на свежую среду процесс образования

нового пучка побегов повторяется. В обоих описанных вариантах побеги образуются из существующих меристем.

На этапе мультипликации иногда возникает явление стекловидности или «витрификации», или гиперводненности побегов. В таких растениях нарушается процесс образования хлорофилла, протеинов, снижается приживаемость при пересадке. Один из возможных путей уменьшения гиперводненности – снижение концентрации цитокининов в среде.

Мультипликацию осуществляют в стеклянных банках объемом 200 мл, в которые помещают по 5 микрочеренков. Во время пассажа микропобеги скальпелем разделяют на микрочеренки по 1–2 междоузлия, и переносят на свежую питательную среду.

Культуры инкубируют при интенсивности освещения 2500 лк, 16-часовом фотопериоде, температуре 20–22 °С. Длительность субкультивирования 40–60 дней (рис. 27).



Рис. 27. Подготовленные для микрочеренкования микрорастения и одноузловые микрочеренки готовые к переносу на свежую питательную среду

4.4.3. Этап ризогенеза микрорастений

Способность побегов к укоренению *in vitro* может во многом определять эффективность технологии клонального микроразмножения. Известно, что 75 % труда сотрудников лаборатории приходится на этап укоренения.

Однако этап ризогенеза не только наиболее трудозатратен, но и требует больших объемов питательной среды, более интенсивного освещения. Укоренение микропобегов *in vitro* существенно

отличается от укоренения зелеными или одревесневшими черенками, возрастом растительного материала, условиями укоренения и качеством полученной корневой системы.

Но вместе с тем, схема ризогенеза *in vitro* и *in vivo* одинакова и подразделяется на следующие этапы: индукция, при которой цитологические события еще не начались, но происходит увеличение содержания фенолов и уменьшение пероксидаз; инициация, при которой можно зафиксировать цитологические события, а также уменьшение содержания фенолов и увеличение активности ИУК – оксидазы; организация, при которой гистологические изменения достаточно видны и наблюдается упадок общей пероксидазной активности; рост – на этом этапе происходит организация радиальных меристем и появление корней.

Успешное прохождение всех этапов ризогенеза зависит от культуры, сорта, условий проведения этапа пролиферации и этапа укоренения, солевого и гормонального состава среды и количества пассажей.

Очень часто укоренение сопровождается формированием каллуса у основания микропобега. Сокращение в среде макроэлементов или азота на половину увеличивает укоренение, а корнеобразование происходит при более низких концентрациях ауксина. На полной среде MS в присутствии ауксина развиваются толстые, короткие корни, на бедных средах – нитевидные. Наличие каллуса нежелательно, так как при пересадке растений в нестерильные условия они могут погибнуть от ботритиса и фузариоза.

Рост и развитие корней *in vitro* зависит от аэрации питательной среды, которая в свою очередь зависит от концентрации агар-агара. Укоренение побегов в плотной среде затруднено, развитие корней второго порядка чаще всего не происходит. Уменьшение концентрации агар-агара существенно увеличивает укоренение побегов и развитие корней второго порядка. Однако при длительном развитии растений на средах с малым содержа-

нием агар-агара (1,5–2,5 г/л) у них появляются признаки витрификации.

Помимо добавления в состав питательной среды регулятора корнеобразования возможно применение ауксинсодержащей тальковой пудры.

На этапе индукции ризогенеза часто применяют питательная среда содержащую 1/2 макро-, микросолей по Мурасига и Скуга (МС), витамины В₁, В₆, РР по 0,5 мг/л, сахарозу – 15000 мг/л, агар-агар – 7000 мг/л. Культуры инкубируют при интенсивности освещения 2500 лк, 16-часовом фотопериоде, температуре 20–22 °С. Формирование корневой системы чаще всего происходит в течение 20–50 дней с момента переноса растений в условия укоренения (рис. 28).



Рис. 28. Корневая система микрорастений винограда сорта Агат Донской *in vitro*

4.4.4. Этап адаптации

При переводе микрорастений в нестерильные условия завершается цикл производственного процесса, который заканчивается получением готовой продукции – адаптированных микро размноженных растений. Адаптированными считаются растения, укоренённые в кассетах, в торфяном субстрате, достигшие определённых параметров (высота, количество листьев, развитие корней), Процесс адаптации и доращивания проходит на территории по-

мещений защищённого грунта (теплиц). Требования к конструкциям теплиц формируются на основе СНиП 2.10.04–85.

Эта часть технологического процесса заключается в посадке укоренённых микро растений в торфяной субстрат и адаптации к условиям влажности защищённого грунта. Адаптация осуществляется путём постепенного снижения влажности воздуха вокруг растений.

Доращивание – процесс, при котором растения достигают необходимого размера и параметров, за счёт создания для их роста оптимальных условий (температуры, увлажнения, освещённости, длины светового дня и минерального питания).

Для этого необходимы следующие материалы: торфяной субстрат, агроперлит, комплексные минеральные удобрения, почвенные фунгициды, пластиковые кассеты для посадки растений.

Промышленное размножение *in vitro* напрямую зависит от способности полученных растений адаптироваться к нестерильным условиям. Адаптация – критическая фаза технологии клонального микро размножения. Условия *in vitro* отличаются коренным образом от условий *in vivo*: более высокой влажностью воздуха, другим содержанием солей по сравнению с почвенным раствором, необходимостью введения в питательную среду синтетических регуляторов роста и сахаров, специфичным газовым составом и накоплением этилена.

Длительное нахождение растительного материала при таких условиях вызывает самые разнообразные анатомические и физиологические аномалии. У растений *in vitro* развиваются нефункциональные устьица, появляются признаки стекловидности, листья теряют способность к активному фотосинтезу, нефункциональная корневая система также не позволяет им достаточно питаться почвенным раствором. Перенос таких растений в нестерильные условия создает стрессовую ситуацию, которая часто приводит к их гибели. Ослабить стресс можно при условии контроля над потерей и поглощением воды.

Таким образом, адаптация включает в себя, как минимум, 4 составных элемента: адаптация надземной части к пониженной влажности воздуха и одновременно к повышенной инфекционной нагрузке, адаптация корневой системы к новому субстрату и новому составу почвенной микрофлоры. Поэтому необходим ступенчатый подход к адаптации растений к нестерильным условиям среды.

В первую очередь необходимо при поддержании влажности близкой к 100 % и относительной стерильности субстрата заставить работать корневую систему. Известно, что у пересаженных в нестерильные условия микрорастений функционирующая корневая система формируется за 2–4 недели в зависимости от породы. Устьица также начинают функционировать через 10–14 дней после пересадки. Резкие колебания влажности воздуха в этот момент губительны для растений.

Вторая ступень адаптации заключается в постепенном снижении влажности воздуха в зоне надземной части растений. Пяти дней, в течение которых адаптация должна проходить постепенно, как правило, достаточно для того, чтобы обеспечить полную сохранность растений. В этот период необходимо создать такие условия для растений, чтобы условия культивирования были наиболее близкими к естественным и способствовали наиболее активной вегетации.

В течение периода адаптации в теплицах поддерживается высокая относительная влажность 75–90 % и температура воздуха 22–28 °С, а также освещенность 2–5 тыс. лк при фотопериоде 15–18 ч.

Во многом результативность этапа адаптации определяется биологическими особенностями культуры и сроками переноса растений в субстрат.

Оптимальным временем для высадки микрорастений на адаптацию является конец марта – начало июня. Перед переносом укорененных микрорастений из стерильных условий в условия авто-

трофного питания – этап адаптации, их обрабатывают 1%-м раствором перманганата калия и пересаживают в стерильный субстрат: смесь торфа с перлитом в соотношении 3:1.

Для стерилизации субстрата его проливают горячей водой, обрабатывают растворами фунгицидов (максим, бенлат, превикур, эупарен), противомикробным раствором с добавлением терразола или горячим паром.

Для обеспечения приживаемости растений в течение первых двух недель необходима высокая влажность (75–80 %), что достигается в условиях «влажной камеры». Условия асептики соблюдаются в течение 4–5 недель. Через 2–3 недели растения, как правило, дают верхушечный прирост. Затем, растения, достигшие высоты 15–25 см, с развитой корневой системой, пересаживают в горшки с субстратом, состоящим из смеси торфа, листовой земли и песка в соотношении 1:1:1.

Отмечается, что растения, высаженные на адаптацию после укоренения в стерильных условиях, имеют более развитую корневую систему, интенсивнее растут и имеют осенью более вызревшие побеги, по сравнению с растениями, укорененными непосредственно в субстрате.

4.5. Меры предосторожности при работе с химическими веществами в лаборатории

1. На работу в химико-аналитические лаборатории принимаются лица не моложе 18 лет, прошедшие медицинское освидетельствование для решения вопроса о возможности работы в лаборатории.

2. Вновь поступающие на работу допускаются к исполнению своих обязанностей только после прохождения *вводного инструктажа* о соблюдении мер безопасности, инструктажа на рабочем месте и после собеседования по вопросам техники безопасности.

3. Прохождение инструктажа обязательно для всех принимаемых на работу независимо от их образования, стажа работы и должности, а также для проходящих практику или производственное обучение.

4. *Периодический инструктаж* должен проводиться на рабочем месте дважды в год.

5. При переводе сотрудника на новые виды работ, незнакомые операции, перед работой с новыми веществами, а также в случае нарушения работником правил техники безопасности проводится *внеплановый инструктаж*.

6. При работе с сушильными шкафами запрещается их открывать, касаться раскалённых частей и погружённых в него предметов во избежание получения ожогов.

7. При работе в химической лаборатории необходимо надевать халат из хлопчатобумажной ткани.

8. При выполнении работ, связанных с выделением ядовитых газов и пыли, для защиты органов дыхания следует применять респираторы или противогазы и другие средства защиты.

9. При работе с едкими и ядовитыми веществами дополнительно применяют фартуки, средства индивидуальной защиты глаз и рук.

10. Для защиты рук от действия кислот, щелочей, солей, растворителей применяют резиновые перчатки. На перчатках не должно быть порезов, проколов и других повреждений. Надевая перчатки, следует посыпать их изнутри тальком. Для защиты глаз применяют очки различных типов, щитки, маски.

Работа с автоклавом требует осторожности и точного соблюдения всех требований техники безопасности. Работать можно только с проверенными автоклавами и не создавать давление выше указанного в паспорте, приложенном к аппарату. Работающий с автоклавами должен пройти специальный инструктаж и получить допуск к работе с сосудом под давлением.

Для установки автоклавов должны быть отведены специальные комнаты – автоклавные. По требованиям техники безопасности стены, потолки, двери таких комнат изготавливают из котельного железа соответствующей толщины. В помещении обязателен дренаж и система вентиляции. На уровне глаз в стене или в двери делают окошко небольшого диаметра – «глазок», для наблюдения за работой автоклава.

Все помещения лаборатории должны соответствовать требованиям электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019–79.

Все электрооборудование с напряжением свыше 36 В, а также оборудование и механизмы, которые могут оказаться под напряжением, должны быть надёжно заземлены.

Для отключения электросетей на вводах должны быть рубильники или другие доступные устройства. Отключение всей сети, за исключением дежурного освещения, производится общим рубильником.

В целях предотвращения электротравматизма запрещается:

- работать на неисправных электрических приборах и установках;
- перегружать электросеть;
- переносить и оставлять без надзора включенные электроприборы;
- работать вблизи открытых частей электроустановок, прикасаться к ним;
- загромождать подходы к электрическим устройствам.

О дефектах в изоляции проводов, неисправности рубильников, штепсельных вилок, розеток, а также заземления и ограждений – немедленно сообщить электрику.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Разработка элементов технологии ускоренного клонального микроразмножения сортов винограда межвидового происхождения для зон рискованного виноградарства: учебно-методическое пособие / С.В. Акимова, А.К. Раджабов, Д.А. Бухтин, В.В. Киркач. – М.: МЭСХ. 2018. – 80 с.
2. Артамонова Г.А., Бямбауренштейн О. Особенности клонального размножения садовой и лесной земляники в условиях длительного культивирования на питательных средах // Биология культивируемых клеток и биотехнология: тезисы докладов междунар. науч. конф. 2–6 августа 1988 г. – Новосибирск, 1988. – С. 394.
3. Размножение клоновых подвоев яблони отводками, зелеными и одревесневшими черенками / В.К. Бакун, М.Т. Тарасенко [и др.] // Известия ТСХА. – 1985. – Вып. 1. – С. 113–115.
4. Басак А. Химическое стимулирование однолетних саженцев яблони // Посадочный материал для интенсивных садов: научно-техническая конференция. – Варшава, 1994. – С. 13–14.
5. Будаговский В.И. Культура слаброслых плодовых деревьев. – М.: Колос, 1976.
6. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-Прогресс, 1999. – С. 159.
7. Вечернина Н.А. Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм сортов растений методами биотехнологии: дис. ... д-ра биол. наук. – Барнаул, 2006. – С. 325.
8. Интеркалярные (промежуточные) вставки для получения слаброслых деревьев на сильнорослых подвоях / Ю.В. Воскобойников [и др.]. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2013. – С. 27.
9. Высоцкая О.Н. Кривоустойчивость меристем и коллекция сортов земляники (*Fragaria L.*) криобанка ИФР РАН // Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений, посв. 125-летию Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН: матер. всеросс. науч. конф. с межд. участием. – М., 2015. – С. 157–161.
10. Высоцкий В.А. Биотехнологические приемы в размножении и сохранении ценных генотипов садовых культур // Научно-практические

достижения и инновационные пути развития производства продукции садоводства для улучшения структуры питания и здоровья человека. – Мичуринск, 2008. – С. 23–25.

11. Высоцкий В.А. Морфогенез и клональное микроразмножение растений // Культура клеток растений и биотехнология. – М., 1986. – С. 91–102.
12. Высоцкий В.А. Питомник в пробирке // Наука и жизнь. – 1980. – № 4.
13. Гиголашвили Т.С., Родькин О.Н., Реуцкий В.Г. Условия микроразмножения формируют специфический культуральный фенотип // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда: тез. докл. VII Междунар. конф. 25–28 ноября 1997 г. – М., 1997. – С. 413–414.
14. Деменко В.И. Биологические и технологические особенности вегетативных способов размножения в системе производства здорового посадочного материала: дис. ... д-ра с.-х. наук. – М., 2006. – 329 с.
15. Деменко В.И. Микроразмножение садовых растений: учебное пособие для студентов по специальности 310300 – Плодоовощеводство и виноградарство. – М.: ФГОУ ВПО РГАУ-МСХА, 2007. – 55 с.
16. Деменко В.И., Лебедев В.Г. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям // Известия ТСХА. – 2011. – Вып. 1. – С. 60–69.
17. Деменко В.И., Лебедев В.Г., Шестибратов К.А. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям // Известия ТСХА. – 2010. – Вып. 1. – С. 73–85.
18. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов. – Минск: БГУ, 2007. – 25 с.
19. Дорошенко Н.П. Биотехнология – наука и отрасль сельского хозяйства // Научный журнал КубГАУ. – 2016. – № 116(02).
20. Дорошенко Н.Д. Длительное хранение генофонда винограда *in vitro* // Виноград и вино России. – 2001. – № 2. – С. 38–40.

21. Дорошенко Н.Д., Соколова Г.В. Способы создания коллекций винограда // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда: тезисы докладов VII Международной конференции (25–28 ноября). – М., 1997. – С. 521.

22. Дорошенко Н.Д., Хохлова Н.А. Способы создания коллекции генофонда «*in vitro*» // Виноград и вино России. – 1993. – № 6. – С. 32.

23. Длительное хранение *in vitro* вегетативно размножаемых растений в институте растениеводства им. Н.И. Вавилова / С.Е. Дунаева, Э.В. Трускинов, О.Ю. Антонова, З.Х. Пазова, Ю.В. Лупышева, Т.А. Гавриленко // VIII International Conference The Biology of Plant Cells *In vitro* and Biotechnology. Abstract. Saratov, September 9–13. – 2003. – С. 89.

24. Иванова З.Я. Биологические основы и приемы вегетативного размножения древесных растений стеблевыми черенками. – Киев: Наукова думка, 1982.

25. Клональное микроразмножение многолетних растений и долговременное сохранение их коллекции *in vitro* / Е.Б. Кириченко, А. Кудре, Ю. Саланнон, К. Жену–Гуришон, Т.А. Красильникова, Г.В. Бидюкова // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда: тез. докл. VII Международной конференции. – М., 1997. – С. 525.

26. Концевая И.И. Модификация питательных сред при депонировании березы в культуре *in vitro* // Достижения науки и образования. – 2018. – № 7(29). – Т. 1. – С. 9–12.

27. Корнацкий С.А. Комплекс факторов, влияющих на жизнеспособность, рост и развитие микрорастений после культуры *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. – 1999. – Т.6. – С. 64–68.

28. Корнацкий С.А. Культура тканей как модель для изучения адаптационных процессов в онтогенезе плодовых и ягодных растений // Плодоводство и ягодоводство России: сборник научных работ РАСХН. – М., 1996. – Т. III. – С. 84–89.

29. Корнацкий С.А. Технологический аспект клонального микроразмножения // Роль сортов и новых технологий в интенсивном садоводстве: матер. межд. науч.-практич. конф. – Орел, 2003. – С. 169–171.

30. Коровин В.А. Совместимость привоя и подвоя яблони в средней зоне РСФСР и ее диагностика: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07. – Мичуринск, 1974. – 406 с.

31. Либерт Э. Физиология растений. – М.: Изд-во «Мир», 1976.

32. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Технология беспересадочного культивирования яблони и груши *in vitro* // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. – 2016. – № 5 (13). – С. 31–37.

33. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Бурдаева Л.М. Методы культуры ткани в лесной генетике и селекции // Лесхоз, информация. – 2002. – № 6. – С. 40.

34. Метлицкий З.А., Малеев Е.Е. Плодовый питомник. – М.: Сельхозгиз, 1935.

35. Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – Киев: Аграрна наука, 2011. – 344 с.

36. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования / О.И. Молканова, О.И. Коротков, Е.М. Ветчинкина, Н.А. Мамаева, О.Г. Васильева // Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о Земле. – 2010. – Вып. 3. – С. 33–39.

37. Молканова О.И., Ветчинчина Е.М., Сучкова Н.К. Сохранение генофонда ценных растений с помощью культуры тканей // VIII International Conference The Biology of Plant Cells *In vitro* and Biotechnology. – Saratov, September 9–13. – 2003. – С. 211.

38. Мохаммед А.И. Микроразмножение, длительное депонирование и криосохранение *in vitro* малины красной: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1998. – С. 12.

39. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Биотехнологические методы размножения ягодных культур // Научно-практические достижения и инновационные пути развития производства продукции садоводства для улучшения структуры питания и здоровья человека. – Мичуринск, 2008. – С. 63–69.

40. Оптимизация условий культивирования *in vitro* ягодных и декоративных культур / Д.Г. Шорников [и др.] // Вестник ТГУ. – 2010. – Т. 15. – Вып. 2. – С. 640–645.

41. Орлов П.Н., Фастов В.В. Роль периваскулярных волокон в образовании придаточных корней у зеленых черенков садовых растений // Плодоводство. – 1985. – Вып. 6. – С. 102–115.

42. Панькова О.А., Несмелова Н.П. Совершенствование технологических приемов клонального микроразмножения ягодных кустарников // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2008. – № 11. – С. 72–76.

43. Пат. РФ 2522823RU. Способ длительного хранения *in vitro* растений осины / Е.О. Видягина, К.А. Шестибратов; Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). – Заявл. 11.08.2012, опубл. 20.07.2014.

44. Рыжкова Н.С. Стабильность растений земляники садовой (*fragaria ananassa duch.*) после длительного хранения *in vitro*: дис. ... канд. с.-х. наук. – М., 2005. – С. 9–15.

45. Самсонова О.Н., Трущечкин В.Г. Сохранение растений земляники садовой в стерильных условиях // Доклады ВАСХНИЛ. – 1990. – № 10. – С. 31–34.

46. Семенас С.Э., Кухарчик Н.В. Методика клонального микроразмножения сортов земляники садовой // Научные труды Белорусского научно-исследовательского института плодоводства. – 2000. – Т. 13. – С. 138–145.

47. Сидорович Е.А., Кутас Е.Н. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений. – Минск: Навука і тэхніка, 1996. – С. 249.

48. Степанов С.Н. Плодовый питомник. – М.: Колос, 1981.

49. Степанов С.Н., Иванова И.А. Влияние слаборослых интеркалярных подвоев на форму привитых деревьев // Технологии и организация садоводства. – Т. 43. – Мичуринск, 1985.

50. Тарасенко М.Т. Зеленое черенкование садовых и лесных культур. – М.: Изд-во МСХА, 1991.

51. Использование корнесобственных плодовых растений / Л.С. Токарь [и др.]. – Саратов: Саратовское краевое изд-во, 1936.

52. Трущечкин В.Г., Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение плодовых и ягодных культур // Плодоовощное хозяйство. – 1985. – № 1. – С. 43–46.

53. Турбин П.А. Влияние высоты окулировки и глубины посадки на рост и плодоношение деревьев черешни (*Cerasus avium Motncy*) // Садівництво. – 2013. – Вып. 67. – С. 140–145.

54. Ульянова Е.К. Длительность хранения земляники *in vitro* // II Научно-технический бюллетень ВИР. – 1990. – Вып. 197. – С. 57–58.

55. Упадышев М.Т. Клональное микроразмножение некоторых нетрадиционных культур рода *Rubus* // Ягодководство в Нечерноземье. – М.: ВСТИСП, 1993. – С. 10–18.

56. Упадышев М.Т., Высоцкий В.А. Размножение ежевики и малины чёрной методом культуры тканей // Садоводство и виноградарство. – 1991. – № 6. – С. 24–27.

57. Шубакова Н.В. К вопросу о длительном хранении коллекционных образцов черной смородины *in vitro* // II Научно-технический бюллетень ВИР. – 1995. – Вып. 234. – С. 61–62.

58. Эсау К. Анатомия растений. – М.: Изд-во «Мир», 1965.

59. Сохранение и размножение ценных форм ягодных и декоративных растений методами биотехнологии / М.Б. Янковская, Д.Г. Шорников, С.А. Муратова, Н.В. Соловых // Проблемы озеленения городов Сибири и сопредельных территорий: мат. всероссийской научно-практической конф. с международным участием, 18–20 августа 2011 г. – Иркутск, 2011. – Ч. IV, Вып. 44. – С. 160–166.

60. Abbas M.F. Association between branching in maiden apple trees and levels of endogenous auxins // Acta Hort. – 8. – 1978. – P. 59.

61. Alleweldt G. Der Einfluss von Wachstuminhibitoren auf die Langzeitlagerung von *in vitro* Kulture der Rebe / G. Alleweldt, M. Harst-Langenbucher // Vitis. – 1987. – Т. 26. – № 2. – S. 57–64.

62. Augereau J.M., Courtois D., Petiard V. Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil layer // Nestle Res. News, 1986–1987. Vevery. – 1987. – P. 121–124.

63. Bekheet S.A., Taha H.S., Saker M.M. *In vitro* long-term storage of date palm // Biol. Plant. – 2002. – 45. – No 1. – P. 121–124.

64. Blaich R. Recherches sur les cultures de meristemes et d'organes de vinge *in vitro* en vue de la selection et de la conservation de genotypes // Bull O.I.V. – 1985. – Т. 58. – № 650/651. – P. 391–395.

65. Brindgen M.P., Staby G.L. Low Pressure and Low Oxygen Storage of *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum morifolium* Tissue Cultures // Plant Sci. Lett. – 1981. – V. 22. – № 1. – P. 177.

66. Bunt A. C. Modern potting composts: a Manuel on the preparation and use of growing media to pot plants. University Park. P.A. // The Pennsylvania State University Press. – 1976. – P. 277.

67. Chiharu Nakamura et. al. Correlation between Auxin Resistance and the Lack of a Membrane – bound Auxin Binding Protein and Root Specific Peroxidase in *Nicotiana Tabacum* // *Plant. Physiol.* 88. – 1988. – P. 845–849.

68. Cummins J.H., Aldwinckle H.S. Apple rootstock breeding. – 1983.

69. Druart P. In vitro germplasm preservation technique for fruit tree // In vitro techniques. Propagation and long term storage. Dordecht etc. – 1985. – P. 167–171.

70. Evert et.al. Limb Girdling Influences Rooting Survival. Total Sugar and Starch of Dormant Hardwood Peach Cuttings // *Hort. Science.* – 25(10). – 1990. – P. 1224–1226.

71. Fartais L., Strajeru S., Avramiuc M. Conservarea explantelor de cartof pe mediu cu inhibitor osmotic (Manitol) // *Cer. Genet, Veg. si Anim.* – 1998. – № 5. – P. 231–236.

72. Florin B., Tessereau H., Petiard V. Conservation a long terme des ressources genetiques de cafeier par cryoconservation d'embryons zygotiques et somatiques et de cultures embryogenes // *ISeme Colloq. sei. int. cafe, Montpellier, 6–11 juin, Paris.* – 1993. – Vol. 1. – P. 106–114.

73. Gainza F. et.al. Graft Incompatibility in plants: Metabolic change during formation and establishment of rootstock scion union with emphasis on Prunes species // *Chilean Journal an Agriculture Research.* – T. 75–2015.

74. Golmirzaie A., Panta A. Advances in potato cryopreservation by vitrification // OP program report 1995–96. International Potato Center, Lima, Peru. – 1997. – P. 71–76.

75. Effect of in vitro storage at 4°C on survival and proliferation of poplar shoots / J.F. Hausman, O. Neys, C. Kevers, T. Gaspar // *Plant. Cell, Tissue and Organ Cult.* – 1994. – V. 38. – № 1. – P. 65–67.

76. Heinz K. Wutscher. Alteration of Fruit Tree Nutrition through Rootstocks // *Hort. Science.* – 1989. – V. 24 (4). – P. 578–884.

77. Howard B.H. et.al. Rooting response to wounding winter cuttings of M26 apple rootstock // *J. of Hort. Science.* – 1984. – 59(2). – P. 131–139.

78. Howard et.al. Factors affecting the rooting response of fruit tree cuttings to IBA treatment // *Acta Horticult.* – 1986. – V. 11. 179. – P. 829–840.

79. Jarret R.L., Gawel N. Abscisic acid-induced growth inhibition of sweet Potato (*Ipomoea batatas L.*) in vitro // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2004. – V. 24. – № 1. – P. 13–18.

80. Ken Munde et.al. A History of Grafting // *Hortic. Rev.* – 2009. – V. 35. – P. 437–493.

81. Lizarraga R., Huaman Z., Dodds J.H. In vitro conservation of potato germplasm at the International potato center // *Am. Potato J.* – 1989. – T. 66. – N 4. – P. 253–269.

82. Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laural (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip cultures // *Ccmb Proc Intl Soc.* – 1980. – 30: – P. 421–427.

83. Lochard R.G., Schneider G.W. Stock and Scion Growth Relationships and the Mechanism in Apple // *Horticult. Rev.* – 1981. – V. 3. – P. 317–375.

84. Long R.D., Curtin T.F., Cassels A.C. An investigation of the effects of bacterial contaminations on potato nodal cultures // *Acta Hort.* – 1988. – V. 225. – P. 83–90.

85. Loreti F., Pisani P.L. Physiological and technique factors affecting rooting in woody species // *Proceed.XX1 Inter. Hort.Congress.* – 1982. – P. 294–310.

86. Luckwill L.C. Growth Regulators in Crop Production // *Studies in Biology.* – 1981. – N. 129.

87. Mix G., Schittenhelm S. Langzeitlagerung von Topinambur (*Helianthus tuberosus L.*) in vitro // *Landbauforschung volkenrode.* – 1988. – № 3. – S. 178–181.

88. Paques M. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects // *Acta Hort.* – 1991. – V. 289. – P. 283–290.

89. Quilin J.D. The Use of Growth regulations for shaping young fruit trees // *Acta Hort.* – 1978. – 80. – P. 396–48.

90. Reed B.M. Cryopreservation of in vitro tissue of deciduous forest trees // *Plant Cryopreservation: A Practical Guide.* (ed). New York: Springer. – 2007. – Section II. – P. 365–386.

91. Romano A. Conservasao in vitro de germeplasma de sobreiro (*Quercus suber L.*) // *J. Rev. Biol.* – 1994. – № 1–4. – P. 29–42.

92. Sakai A., Yamakawa M., Sakata D., Harada T., Yakuwa T. Development of Whole Plant from an Exeised Strawberry Runner Apex Frozen to $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ // Low Temp. Sci.: Sec. B. – 1978. – V. 36. – P. 31.

93. Tim D. Davis, Potter J.R. Relations between carbohydrates, water status and adventitial root formation in leaf pea cuttings rooted under various levels of atmospheric CO_2 // Physiologies Plantarum. – 1989. – 77.– P. 185–190.

94. Towill L.E. Biotechnology and germplasm preservation // Plant Breed. Rev. – 1989. – № 7. – P. 159–182.

95. Wafaa W. In vitro storage of proliferated apple rootstock shoot–tip cultures // Annals Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo. – 1992. – Vol. 37. – № 2. – P. 501–510.

96. Wilkins H.E. Influence of Light on Branching cutting Production and Rooting // Proceed. XX1. Inter. Hort. Congress. – 1982. – P. 894–903.

97. Zarske A., Schuh D. Erste Ergebnisse der Langzeitlagerung ausgewahlter Kulturpflanzenarten // Gartenbau. – 1984. – V. 31. – № 1. – P. 8–12.

Учебное издание

ДЕМЕНКО Василий Иванович
АКИМОВА Светлана Владимировна
КИРКАЧ Вадим Валерьевич
ВИКУЛИНА Александра Николаевна

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИННОВАЦИОННЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ ВЕГЕТАТИВНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ
САДОВЫХ КУЛЬТУР

Учебное пособие

Издается в авторской редакции
Техн. редактор *Т.Б. Самсонова*

Подписано в печать 30.09.2019. Формат 60×84/16.
Уч.-изд. л. 7,3. Печ. л. 9,75. Тираж 300 экз. Заказ № 474.

Отпечатано в АНО Редакция журнала «МЭСХ»
127412, Москва, ул. Б. Академическая, д. 44, корп. 2, e-mail: t_sams@mail.ru