

УДК 581.163 + 582.623.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ  
ДЛЯ МАССОВОГО ПОЛУЧЕНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА  
ДЕКОРАТИВНЫХ И ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР  
В БОТАНИЧЕСКОМ САДУ СГУ

**Е. А. Блюднева, Т. А. Крицкая, А. С. Кашин**

*Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского  
Учебно-научный центр «Ботанический сад»  
410010, г. Саратов, ул. Ак. Навашина, 1  
E-mail: kriczkaya.tatyana@mail.ru, kashinas2@yandex.ru*

В культуру *in vitro* введены растения 29 сортов 14 видов 13 родов, принадлежащих к 3 семействам. Для каждого сорта или вида растений оптимизированы условия стерилизации эксплантов, состав питательных сред на стадиях эксплантации, микроразмножения и укоренения регенерантов. Получение посадочного материала этих форм растений на основе клонального микроразмножения доведено до стадии создания малой серии продукции.

**Ключевые слова:** клональное микроразмножение, получение посадочного материала растений.

THE USE OF CLONAL MICROPROPAGATION FOR MASS  
PRODUCTION OF PLANTING MATERIAL OF ORNAMENTAL AND  
FRUIT CROPS IN THE BOTANICAL GARDEN OF SARATOV STATE  
UNIVERSITY

**E. A. Bludneva, T. A. Kritskaya, A. S. Kashin**

There are 29 varieties of 14 species of 3 families introduced in the *in vitro* culture. It is optimized conditions of the sterilization of the explants, the composition of the culture media at the stages of explantation, microreproduction and rooting for the each varieties/species of plants. The generation of planting material of this forms of plants brought to the stage to the making a small series production.

**Key words:** clonal micropropagation, generation of planting material.

В последние десятилетия метод клонального микроразмножения растений получил широкое распространение в России и за рубежом. В

основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность, то есть давать начало целому растительному организму под влиянием экзогенных воздействий (Катаева, Бутенко, 1983). Ряд преимуществ, отличающих культуру *in vitro* от традиционных способов вегетативного размножения растений (высокий коэффициент репродукции; ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития; воспроизводство трудно размножаемых традиционными способами растений; получение оздоровленного безвирусного материала; возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала), позволил занять данному методу прочные позиции в современной биотехнологии.

Процесс клонального микроразмножения принято разделять на четыре этапа: 1) выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры; 2) собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества микропобегов; 3) укоренение размноженных побегов; 4) адаптация их к почвенным условиям, выращивание растений в условиях теплицы (Бутенко, 1999).

В настоящее время опубликовано большое число работ по усовершенствованию методов клонального микроразмножения растений и по подбору условий культивирования для различных растительных объектов (Высоцкий, 2006; Митрофанова и др., 1997; Коновалова, 2008; Семерикова и др., 2008; Митрофанова, 2009). Наиболее полно разработанные технологии находят свое применение в сельском хозяйстве и при массовом производстве посадочного материала.

Исследования по подбору условий культивирования с целью получения посадочного материала ряда видов и сортов декоративных и плодовых культур с использованием клонального микроразмножения были начаты в учебно-научном центре «Ботанический сад» СГУ им. Н. Г. Чернышевского весной 2011 г. на базе лаборатории микроразмножения, созданной в ходе реализации Программы развития инновационной инфраструктуры СГУ «Развитие инновационной инфраструктуры национального исследовательского университета путем создания высокотехнологичных научно-образовательных производственных структур».

На данный момент коллекция культиваров насчитывает 67 сортов, 34 вида 29 родов, принадлежащих 16 семействам. Из них растения 29 со-

ртов 14 видов 13 родов, принадлежащих к 3 семействам, были введены в культуру *in vitro* сотрудниками лаборатории микроклонального размножения УНЦ «Ботанический сад» СГУ. Для реализации методов клонального микроразмножения выбирались растения с ценными признаками (плодово-ягодные, декоративно-цветущие и др.). Часть образцов уже в виде пробирочных культур была любезно предоставлена коллегами из других ботанических садов (таблица). Для всех введённых в культуру *in vitro* видов и форм растений технология получения посадочного материала на основе клонального микроразмножения растений доведена до стадии создания малой серии продукции. Общее количество растений-регенерантов, адаптированных к нестерильным условиям, составила около 3.5 тысяч экземпляров.

**Особенности отбора эксплантов и их ввода в стерильную культуру.** Изоляция эксплантов производилась в сухую погоду, растения-доноры оценивались визуально. Большое внимание уделялось качеству побегов, отсутствию на них следов внешних повреждений и/или поражения инфекцией. В качестве первичных эксплантов использовались латеральные почки и узловое сегменты побегов текущего года. Наиболее оптимальным сроком изоляции являлась фаза активного роста растения (период апрель-май и сентябрь-октябрь).

Поверхностная стерилизация проводилась согласно общепринятой методике. В работе с древесными растениями возник ряд трудностей. Так как исходный материал брался из полевых условий, он отличался высокой степенью внешней и внутренней загрязнённости, особенно при изъятии материала летом, во время активного роста. Для повышения эффективности стандартной методики применялось предварительное выдерживание объектов в растворе синтетического моющего средства в течение 20–30 минут с последующим отмыванием их в проточной воде. Также применялась дополнительная дробная стерилизация растворами фунгицида и/или антибиотика, чтобы уничтожить патогенные микроорганизмы и споры грибов.

В качестве основных стерилизующих агентов использовались растворы гипохлоритов (в частности бытовые отбеливатели «Белизна» и «Domestos») и препарата «Лизоформин-3000». Концентрация раствора зависела от размеров эксплантов, наличия или отсутствия покровных чешуй, степени загрязнённости. Питательной инициальной средой для первичных эксплантов являлась среда по Мурасиге и Скугу (Murashige,

Перечень объектов коллекции *in vitro* лаборатории микроклонального размножения растений  
УНЦ «Ботанический сад» СГУ

№	Семейство	Название видо- или сортообразца	Введено в культуру сотрудниками
1		<i>Fragaria</i> × <i>anapassa</i> Duchesne ex Rozlet сорт «Московский деликатес»	ВРБС*
2		<i>Cerasus vulgaris</i> Mill. сорт «Студенческая»	УНЦ БС СГУ**
3		<i>Cerasus vulgaris</i> Mill. сорт «Молодёжная»	УНЦ БС СГУ
4		<i>Cerasus vulgaris</i> Mill. сорт «Орлица»	УНЦ БС СГУ
5		<i>Cerasus vulgaris</i> Mill. сорт «Банкетная»	УНЦ БС СГУ
6		<i>Cerasus vulgaris</i> Mill. сорт «Русинка»	ГБС
7		<i>Kerria japonica</i> (L.) DC.	УНЦ БС СГУ
8		<i>Pentaphylloides fruticosus</i> (L.) O. Schwarz сорт «Goldfinger»	УНЦ БС СГУ
9	Rosaceae	<i>Prunus domestica</i> L. сорт «Султан Эрик»	НБС-ННЦ***
10		<i>Prunus divaricata</i> Ldb. сорт «Алая заря»	УНЦ БС СГУ
11		<i>Rosa hybrida</i> L. сорт «Crimson Glory»	УНЦ БС СГУ
12		<i>Rosa chinensis</i> Jacq.	УНЦ БС СГУ
13		<i>Rubus idaeus</i> L. сорт «Шапка Мономаха»	ВРБС
14		<i>Rubus idaeus</i> L. сорт «Брянское диво»	ВРБС
15		<i>Rubus idaeus</i> L. сорт «Бальзам»	УНЦ БС СГУ
16		<i>Rubus idaeus</i> L. сорт «Бриллиантовая»	ГБС****
17		<i>Rubus idaeus</i> L. сорт «Золотая осень»	ГБС
18		<i>Rubus idaeus</i> L. сорт «Оранжевое чудо»	ГБС

Продолжение таблицы

№	Семейство	Название видо- или сортообразца	Введено в культуру сотрудниками
19		<i>Rubus caesius</i> L. сорт «Честер Торнлесс»	ВРБС
20		<i>Rubus caesius</i> L. сорт «Tomfree»	УНЦ БС СГУ
21	Rosaceae	<i>Rubus caesius</i> L. сорт «Блэк Сэтин»	ВРБС
22		<i>Sorbus aucuparia</i> L. сорт «Гранатная»	УНЦ БС СГУ
23		<i>Spiraea japonica</i> L. сорт «Shigobana»	УНЦ БС СГУ
24		<i>Stephanandra tanakae</i> Franch. Et Sav.	УНЦ БС СГУ
25		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Зуша»	УНЦ БС СГУ
26		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Чудное мгновение»	УНЦ БС СГУ
27		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Элевеста»	УНЦ БС СГУ
28		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Багира»	УНЦ БС СГУ
29		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Загадка»	УНЦ БС СГУ
30	Grossulariaceae	<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Десертная Ольхиной»	УНЦ БС СГУ
31		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Гамерлан»	УНЦ БС СГУ
32		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Дачница»	УНЦ БС СГУ
33		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Черный жемчуг»	УНЦ БС СГУ
34		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Маленький принц»	УНЦ БС СГУ
35		<i>Ribes nigrum</i> L. сорт «Чаровница»	УНЦ БС СГУ
36		<i>Rhododendron ponticum</i> L. сорт «Мадам Массон»	ГБС
37	Ericaceae	<i>Rhododendron brachycarpum</i> D. Don	ГБС

Продолжение таблицы

№	Семейство	Название видо- или сортообразца	Введено в культуру сотрудниками
38		<i>Rhododendron brachycarpum</i> D. Don сорт «Helsinki University»	ГБС
39		<i>Rhododendron brachycarpum</i> D. Don сорт «Haaga»	ГБС
40	Ericaceae	<i>Rhododendron hybridum</i> Ker Gawl. сорт «Hellikii»	ГБС
41		<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. сорт «Мазовия»	ГБС
42		<i>Vaccinium uliginosum</i> L. сорт «North country»	ГБС
43		<i>Lonicera caerulea</i> L. сорт «Желка»	ВРБС
44		<i>Lonicera caerulea</i> L. сорт «Московская 23»	ВРБС
45	Caprifoliaceae	<i>Lonicera caerulea</i> L. сорт «Камчадалка»	УНЦ БС СГУ
46		<i>Lonicera caerulea</i> L. сорт «Лазурная»	УНЦ БС СГУ
47		<i>Weigela x hybrida</i> Jacq. сорт «Eva Rathke»	УНЦ БС СГУ
48		<i>Weigela x hybrida</i> Jacq. сорт «Candida»	УНЦ БС СГУ
49		<i>Clematis x jouiniana</i> Schneid сорт «Серебряный ручей»	ВРБС
50	Ranunculaceae	<i>Clematis x jouiniana</i> Schneid сорт «Изобилие»	ВРБС
51		<i>Clematis x jouiniana</i> Schneid сорт «Принцесса Диана»	ВРБС
52		<i>Clematis x jouiniana</i> Schneid сорт «Полярный»	ВРБС
53		<i>Syringa vulgaris</i> L. сорт «Сенсация»	ГБС
54	Oleaceae	<i>Syringa vulgaris</i> L. сорт «А. Громов»	ГБС
55		<i>Syringa vulgaris</i> L. сорт № 87 «Мадам Казимир Перье»	ГБС

Окончание таблицы

№	Семейство	Название видо- или сортообразца	Введено в культуру сотрудниками
56	Actinidiaceae	<i>Actinidia kolomikta</i> (Maxim.&Rupr.) Maxim. сорт «Изобильная», ♀♂	ВРБС
57		<i>Actinidia arguta</i> (Siebold&Zucc.) Planch. ex Miq × <i>Actinidia purpurea</i> , ♀♂	ВРБС
58	Solanaceae	<i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> Vilm. сорт «Жемчужный прибор»	ВРБС
59		<i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> Vilm. сорт «Salmon sargi»	ВРБС
60	Gesneriaceae	<i>Saintraulia ionantha</i> H. Wendl. сорт «Полярный медведь»	ВРБС
61	Agavaceae	<i>Agave americana</i> L.	НБС-ННЦ
62	Saxifragaceae	<i>Heuchera</i> × <i>hybrida</i> L. сорт «Crème Brulee»	ГБС
63	Asparagaceae	<i>Hosta sieboldiana</i> Engl.	ВРБС
64	Commelinaceae	<i>Tradescantia</i> × <i>andersoniana</i> W. Ludw. сорт «Sweet Kate» от-крытого грунта	ГБС
65	Liliaceae	<i>Lilium caucasicum</i> (Misch. ex Grossh.) Grossh.	ВРБС
66	Alliaceae	<i>Allium regelianum</i> A. Beck.	ВРБС
67	Fabaceae	<i>Calophasa wolgarica</i> (L. fil.) DC.	ВРБС

Применение. ВРБС\* – Волгоградский региональный ботанический сад, г.Волгоград; УНЦ БС СГУ\*\* – Учебно-научный центр «Ботанический сад СГУ», г. Саратов (объекты введены в культуру *in vitro* сотрудниками лаборатории микрочлониального размножения растений); НБС-ННЦ\*\*\* – Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, г.Ялта, Украина; ГБС\*\*\*\* – Главный ботанический сад имени Н. В. Цицина РАН, г.Москва.

Skoog, 1962), дополненная 6-БАП в концентрации 0.1–0.5 мг/л. В некоторых случаях в инициальную среду добавлялась ГК в концентрации 0.1–1.5 мг/л для активации вывода осенних почек из состояния покоя. Полученные экспланты ежедневно осматривались на наличие инфекции и некроза. При наличии видимой инфекции наиболее ценные экспланты повторно подвергались стерилизации и пересадке на новую среду, а менее ценные – уничтожались. При регистрации внутренней инфекции под основанием побега экспланты пересаживались на среду, содержащую антибиотик в концентрации 100–400 мг/л. При отсутствии какой-либо инфекции на 7–10-й день после посадки экспланты переводились на этап размножения.

#### **Условия культивирования и собственно микроразмножения.**

Для этапа размножения микропобегов наиболее универсальной средой была MS с добавлением цитокининов. Помимо нее в нашей работе были использованы питательные среды Woody plant medium (Lloyd, McCown, 1980), QL (Quoirin, Lepoivre, 1977), B<sub>5</sub> (Gamborg, Eveleigh, 1968), Нича (Nitsch, 1969), Андерсона (Anderson, 1980), Уайта (White, 1934) и их модификации. Для разных сортов (даже в пределах одного вида) минеральный состав питательной среды подбирался индивидуально. Успешные результаты были получены при чередовании сред с разным минеральным составом, что подтверждает литературные данные (Шипунова, 2009). Например, у черной смородины сортов «Зуша», «Багира» и др. качество эксплантов заметно улучшалось при чередовании пассажей на среды MS и WPM. Единственным источником углеводов в среде служила сахароза.

В качестве цитокининов чаще всего использовались 6-БАП, кинетин и зеатин. Концентрация цитокининов подбиралась индивидуально в зависимости от состояния экспланта и желаемого результата, чаще всего она составляла от 1,0 до 3,0 мг/л (рис. 1, 2). Повышенная концентрация 6-БАП приводила к увеличению коэффициента размножения, однако побеги в этом случае получались маленькими, трудно отделяемыми от основного побега, наблюдалось обводнение побегов. Иногда совместное использование цитокининов и ауксинов в соотношении 10:1 или 5:1 на этапе размножения давало значительное увеличение коэффициента размножения.

Культивировались растения при температуре 22–25°C, при 16-часовом фотопериоде. Длительность пассажа составляла от 20 до 60 дней.



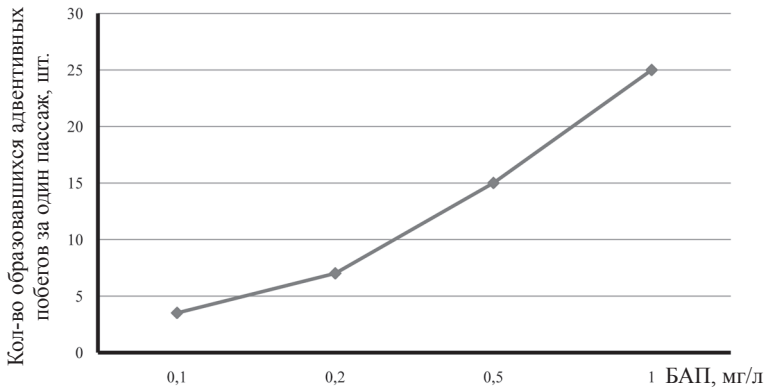


Рис. 1. Зависимость количества образовавшихся адвентивных побегов за один пассаж от концентрации БАП (мг/л) у чёрной смородины сорта «Зуша»



Рис. 2. Микропобеги чёрной смородины сорта «Зуша» на средах с различной концентрацией БАП, мг/л, слева направо: 0,1; 0,2; 0,5

Для подготовки побегов к последующему этапу ризогенеза экспланты пересаживались на среды, содержащие ГК в концентрации 0,5–1,0 мг/л, либо БАП замещался на кинетин в концентрации 1–2 мг/л, что способствовало «вытягиванию» побегов по длине и улучшало качество листовой пластинки (рис. 3).



Рис. 3. Малина сорта «Золотая осень»: слева – экспланты на этапе микроразмножения на среде с БАП 0,5 мг/л; справа – экспланты на этапе доращивания на среде, содержащей кинетин 1,0 мг/л и ГК 0,5 мг/л

**Укоренение побегов.** В качестве сред для укоренения использовались те же среды, на которых размножались экспланты, только минеральный состав уменьшали вдвое, а цитокинины замещались ауксинами. В качестве индукторов ризогенеза для большинства культур использовались ИУК, ИМК и НУК. Наиболее эффективным оказалось использование ИМК в концентрации 1,0 мг/л (вишня, слива). Совместное действие ИМК и ИУК в концентрации по 0,5 мг/л каждая приводило к увеличению процента укоренившихся побегов. Такое сочетание оказалось наиболее эффективным для укоренения различных сортов клематисов, что подтверждает литературные данные (Коротков, Комарова, 2004). Для некоторых их сортов («Изобилие», «Полярный») оказался эффективным прием выдерживания растений в темноте непродолжительное время (3 суток) с последующим возвратом на обычный световой режим. Ризогенез в данном случае составлял от 75 до 100%, причем качество корней также было лучше.

От использования НУК в качестве индуктора ризогенеза мы были вынуждены отказаться из-за усиленного каллусообразования в базальной

части побега, несмотря на то что процент укорененных побегов был не ниже, а в некоторых случаях и выше, чем на ИМК (рис. 4, 5).

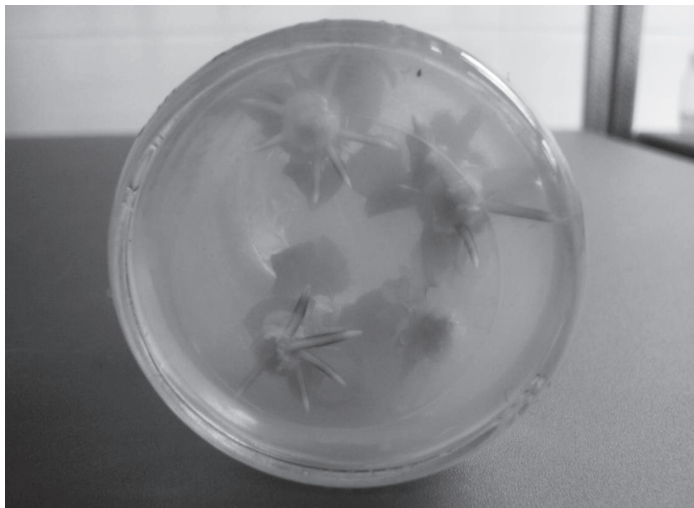


Рис. 4. Ризогенез клематиса «Полярный» на среде  $\frac{1}{2}$  MS с НУК 1,0 мг/л



Рис. 5. Ризогенез клематиса «Полярный» на  $\frac{1}{2}$  MS с ИМК 0,5 мг/л

**Адаптация к нестерильным условиям.** Укорененные растения-регенеранты извлекали из питательной среды, отмывали дистиллированной водой и высаживали в смесь земли, песка и торфа в соотношении 3:1:1. Предварительно субстрат проливался раствором «Фитоспорин».

Адаптацию регенерантов к тепличным условиям производили при 23–24°C и 16-часовом фотопериоде. Сосуды с высаженными регенерантами помещали в герметично закрытые полиэтиленовые пакеты.

Со второго дня после высадки регенерантов полиэтиленовые пакеты приоткрывали на несколько часов в день, с каждым днем увеличивая время экспозиции с целью адаптации растений.

Через 2 – 3 недели после высадки регенерантов сосуды с ними полностью освобождали от полиэтиленовых пакетов. К этому времени регенеранты адаптировались к нестерильным условиям и давали прирост. Выживаемость регенерантов составила 75–90%.

### Заключение

В культуру *in vitro* введены растения 29 сортов 14 видов 13 родов, принадлежащих к 3 семействам цветковых. Получение посадочного материала этих форм растений на основе клонального микроразмножения доведено до стадии производства малой серии продукции.

**Благодарности.** Благодарим сотрудников лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений Никитского ботанического сада – Национального научного центра (Украина) и лично проф. И. В. Митрофанову; сотрудников лаборатории биотехнологии растений Главного ботанического сада им. Н. В. Цицина РАН и лично канд. с.-х. наук О. И. Молканову; сотрудников Волгоградского регионального ботанического сада и лично канд. биол. наук О. И. Короткова за неоценимую помощь, оказанную нам в период становления лаборатории.

### Список литературы.

Бутенко Р. Г. Биология культивируемых клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М. : ФБК-Пресс, 1999. 159 с.

Висоцкий В. А. Биотехнологические приёмы в решении задач современного садоводства // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира : материалы Всерос. науч.-практ. конф. Волгоград, 24–25 августа 2006 г. Волгоград : Издатель, 2006. С. 6–11.

*Катаева Н. В., Бутенко П. Г.* Клональное микроразмножение растений. М., 1983. 96 с.

*Шпунунова А. А.* Клональное микроразмножение сортовой вишни // Вестн. Тюмен. гос. с.-х. академии. 2009. № 3 (10). С. 27–31

*Коротков О. И., Комарова И. А.* Особенности укоренения сортовых групп клематисов в зависимости от их происхождения : материалы IX Региональной конф. молодых исследователей Волгогр. обл. Волгоград, 9–12 ноября 2004 г. Волгоград, 2004. С. 27–28.

*Anderson W. S.* Mass propagation by tissue culture : principls and techniques // On nursery production of fruit plants through tissue culture-applications and feasibility : Proc. of confer. Maryland, 1980. P. 1–10.

*Gamborg O. L., Eveleigh D. E.* Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. 1968. Vol. 46, № 5. P. 417–421.

*Lloud G., McCown B.* Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 1980. Vol. 30. P. 420–427.

*Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, № 13. P. 473–497.

*Nitsch J. P.* Experimental androgenesis in *Nicotiana* // Phytomorphology. 1969. Vol. 19, № 3. P. 389–404.

*Quoirin M., Lepoivre P.* Improved medium for in vitro culture of *Prunus* sp. // Acta Hortic. 1977. Vol. 78. P. 437–442.

*White P. R.* Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium // Plant Physiol. 1934. Vol. 9. P. 585–600.

УДК 581.543.6:581.48:631.531(031)

## ОСОБЕННОСТИ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН *SALVIA TESQUICOLA* КЛОК. & РОВЕД В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

**Т. Ю. Гладиллина, И. В. Шилова**

*Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского*  
*Учебно-научный центр «Ботанический сад»*  
*410010, Саратов, ул. Академика Навашина, 1*  
*E-mail: flor1980@mail.ru*

Приводятся результаты лабораторных исследований особенностей прорастания семян шалфея сухостепного, собранных с коллекционных растений. Установлено, что семена шалфея сухостепного всходят не энергично, всхо-