

Охрана и обогащение биологического разнообразия видов : материалы междунар. конф. Воронеж : Воронежское книжное изд-во, 2002. С. 115–116.

Салмина А. Н. Совершенствование сортимента пиона травянистого и методов его ускоренного размножения : автореф. дис. ... канд. сельхоз. наук. М., 1999. 24 с.

Тимохин В. И. Культура пионов и способы размножения // Интродукция и приемы культуры цветочно-декоративных растений. М. : Наука, 1977. С. 123–133.

УДК 581.143.6

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ ЕЖЕВИКИ (*RUBUS CAESIUS* L. SUBSP. *EUBATUS* FOCKE, ROSACEAE) СОРТА «ТОРНФРИ»

А. С. Решетова, С. Н. Тимофеева, А. С. Кашин

Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83
e-mail: kashinas@sgu.ru

Приводятся данные по подбору оптимального варианта стерилизации эксплантов *Rubus caesius* L. subsp. *eubatus* Focke, Rosaceae, сорта «Торнфри». Показано, что полевой материал больше подвержен действию внутренней инфекции, чем тепличный, а также выявлено, что больший по размерам эксплант лучше развивается, однако труднее поддается стерилизации. Получена стабильно растущая стерильная культура для дальнейших исследований.

Ключевые слова: *Rubus caesius* L. subsp. *eubatus* Focke, Rosaceae, микроклональное размножение, эксплант, стерильная культура.

INTRODACTION OF BLACKBERRY (SORT «TORNFREE») INTO THE CULTURE

A. S. Reshetova, S. N. Timofeeva, A. S. Kashin

The data of selection of optimal variant of explants defertilization (sort «Tornfree») are given. The field material is shown to be undergone of internal infection more then a hothours one. It is also educed that a bigger explants develops better though it is more difficult to sterilize it. The stable growing sterile culture has been got for further research.

Key words: *Rubus caesius* L. subsp. *eubatus* Focke, Rosaceae, microclonal reprdaction, explant, sterile culture.

Современные методы биотехнологии позволяют осуществить ускоренное размножение новых форм, сортов и даже единичных экземпляров

растений, обладающих ценными признаками. В настоящее время микроклональное размножение широко применяется для массового размножения многих хозяйственно-ценных плодовых и декоративных видов (вишня, черешня, слива, абрикос, малина, ежевика, сирень и др.) (Фардзинова, 1999, 2003; Джигадло и др., 2003; Озеровский, 2007; Майорова, 2009). Процесс микроклонального размножения *in vitro* включает следующие основные этапы:

- выбор экспланта и введение его в культуру;
- собственно микроразмножение;
- укоренение микропобегов;
- адаптацию регенерантов к условиям *in vivo*.

Успех всей работы во многом зависит от первого этапа, т.е. правильного выбора исходного растения-донора, отбора эксплантов и их стерилизации, а также подбора и оптимизации состава питательной среды, обеспечивающей наилучший рост и развитие эксплантов.

Известно, что при выборе материнского растения необходимо учитывать его физиологические, сортовые и видовые особенности. Исходные растения должны быть здоровыми, не пораженными грибковыми, бактериальными и вирусными болезнями, находиться в состоянии интенсивного роста.

При выборе экспланта учитывают его возраст, строение и происхождение. Для обеспечения максимальной стабильности клонируемого материала желательно использовать молодые, слабодифференцированные ткани. Для древесных пород используют апикальные и пазушные почки, зародыши, молодые листья, т. е. экспланты, содержащие меристемы. Чем меньше размер экспланта, тем меньше его регенерационная способность. Однако в крупном экспланте увеличивается возможность появления в его клетках вирусов и других патогенов.

Вариант стерилизации подбирается индивидуально и зависит от особенностей экспланта. Успешность выбранной методики стерилизации определяется количеством полученного жизнеспособного материала, пригодного для дальнейшего микроразмножения.

Питательную среду для культивирования также подбирают индивидуально. Используются среды Гамборга, В₅, Нича, Ли де Фоссарда и др. Однако наиболее широко в культуре древесных растений применяется среда Мурасиге и Скуга в стандартной или половинной концентрации солей. В питательные среды на каждом этапе культивирования вводятся различные фитогормоны. На этапе инициации и собственно микроразмножения часто используется БАП в различных концентрациях (0,5–5,0 мг/л).

Целью данной работы было изучение особенностей введения в культуру ежевики сорта «Торнфри» (выбор экспланта и подбор оптимального варианта стерилизации), получение безвирусного материала и возможность дальнейшего микроклонального размножения стерильной культуры в условиях *in vitro*.

Материал и методика

Объектом исследований является стелющаяся форма ежевики (*Rubus caesius* L. ssp. *eubatus* Focke, Rosaceae) сорта «Торнфри». Кустарник, покрытый шипами разной формы и шипиками, с вегетативными побегами 1-го года (турионами) и репродуктивными побегами 2-го года. Листья сложные, из 3–7 (9) пальчато расставленных листочков. Цветки обоеполые в небольшом числе в щитковидных соцветиях. Плоды черные или черно-красные, спрессованные с цветоножкой и отделяющиеся вместе с его верхней частью. Произрастает по приречным кустарникам и лесам, оврагам, склонам, закустаренным лугам (Красовская, 2001; Маевский, 2006).

Разводится ежевика семенами (высеваемыми осенью), черенками, корневыми отпрысками и отводками на глинисто-известковой почве, небогатой перегноем, в хорошо освещенных местах.

В качестве эксплантов использовались пазушные почки и узловые сегменты побегов ежевики.

Для стерилизации применяли общепринятые средства – растворы СМС, 70% спирт и 0,1% раствор сулемы. Подбор оптимального варианта стерилизации осуществлялся с помощью изменения времени обработки данными агентами и дополнительной обработкой фунгицидом «Фундазол» в некоторых вариантах. Растительный материал стерилизовался по следующей схеме. Экспланты выдерживались в растворе СМС с добавлением детергента TWIN 20 с последующим отмыванием в проточной воде. Затем экспланты обрабатывались 70% спиртом и 0,1% раствором сулемы. После этого побеги трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой (Алешина, Болдырева, 2003).

Стерильные экспланты высаживали в чашки Петри на питательную среду по Мурасиге и Скугу с добавлением фитогормона 6-бензиламинопурина. По мере развития эксплантов их переносили на свежую питательную среду. В процессе собственно размножения пассажи производились каждые 3–4 недели. После 3–4 пассажей часть микропобегов переносилась на питательную среду для укоренения с целью получения регенерантов для посадки в грунт.

Культивирование *in vitro* проводилось при 25 °С и 16-часовом фотопериоде.

Результаты и их обсуждение

В ходе подбора оптимального варианта стерилизации жизнеспособные экспланты были получены в двух экспериментах (табл. 1). В первом опыте стабильно растущая стерильная культура была получена лишь в одном случае, что составило 8,3% от общего числа посаженных эксплантов.

Таблица 1. Выживаемость первичных эксплантов в зависимости от варианта стерилизации

Исходный материал	Вариант стерилизации	Всего посажено эксплантов, шт.	Из них стерильных эксплантов через 1 месяц культивирования	
			шт.	%
Тепличный	10 мин 2% СМС; 15 мин проточная вода; 10 мин 0,1% р-р сулемы; 3-кратная промывка стерильной водой	12	1	8,3
Полевой	15 мин 2% СМС; 15 мин проточная вода; 2 мин 70% спирт; 15 мин 0,1% р-р сулемы; 3-кратная промывка стерильной водой	13	0	0
	20 мин 2% СМС; 60 мин проточная вода; 2 мин 70% спирт; 20 мин 0,1% р-р сулемы; 3-кратная промывка стерильной водой	11	0	0
	20 мин 2% СМС; 60 мин проточная вода; 20 мин 7% р-р «Фундазола»; 2 мин 70% спирт; 20 мин 0,1% р-р сулемы; 3-кратная промывка стерильной водой	9	0	0
	20 мин 2% СМС; 60 мин проточная вода; 15 мин 3% р-р «Фундазола»; 2 мин 70% спирт; 20 мин 0,1% р-р сулемы; 3-кратная промывка стерильной водой	14	9	64,3

В двух последующих опытах с целью увеличения процента выживаемости эксплантов увеличивалось время обработки СМС и промывки проточной водой, а также была добавлена обработка 70% спиртом в течение 2 мин. Однако эти изменения в методике стерилизации не принесли ожидаемых результатов – в течение первого месяца культивиро-

вания наблюдалась дегенерация эксплантов от внутренней инфекции в 100% случаев. На основе этого был сделан вывод о необходимости дополнительной обработки полевого материала специальным средством направленного действия. В последующем опыте был использован фунгицид «Фундазол». В дополнение к отработанной схеме стерилизации экспланты обрабатывались его 7% раствором в течение 20 мин. Однако в этом случае наблюдалась 100% дегенерация уже в течение первой недели культивирования. Очевидно, что воздействие фунгицида было слишком длительным и сильным, что привело к отмиранию тканей эксплантов. Поэтому в следующем эксперименте концентрация раствора «Фундазола» была снижена до 3%, а время обработки до 15 мин.

Этот вариант получился успешным – из 14 эксплантов 9 оказались стерильными и жизнеспособными, что составило 64,3% выживаемости. В последующих экспериментах методика стерилизации была оптимизирована – исключена обработка раствором сулемы, что не привело к снижению числа стерильных и жизнеспособных эксплантов.

Таким образом, оптимальной явилась следующая схема стерилизации эксплантов ежевики: 20 мин – обработка 2% раствором синтетического моющего средства, 15 мин – 3% раствором «Фундазола» и 2 мин – 70% этанолом.

При выявлении оптимального размера экспланта было установлено, что более успешно стерилизации подвергаются почки (75%), тогда как из узловых сегментов лишь 50% были стерильны и успешно развивались через 1 месяц культивирования на питательной среде.

Однако дальнейшее развитие интенсивнее идет из более крупных эксплантов, т. е. из узловых сегментов (рис. 1). Наблюдается развитие более мощных и многочисленных микропобегов, а также активное образование каллуса.

Следующим этапом работы был подбор оптимальной концентрации БАП в

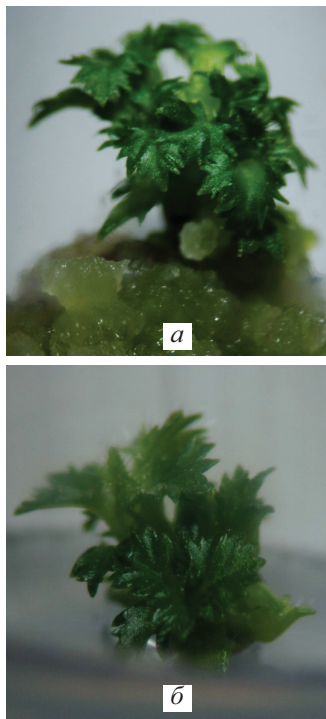


Рис 1. Развитие первичных эксплантов: а – узловый сегмент; б – пазушная почка

питательной среде для получения максимального коэффициента размножения (табл. 2).

Таблица 2. Коэффициент размножения эксплантов в зависимости от концентрации фитогормона БАП в питательной среде

Концентрация БАП, мг/л	Коэффициент размножения микропобегов/эксплант
0,5	4,46±1,40
2,0	3,65±0,63
5,0	15,04±0,34*

Примечание: * Микропобеги слабо развиты, мелких размеров с невозможностью их отделения друг от друга.

Первоначально для размножения эксплантов ежевики в среду MS добавляли 2,0 мг/л БАП. Это дало неплохие результаты: после 3–4 недель культивирования каждый эксплант давал в среднем 3,65±0,63 хорошо сформированных и легко отделяющихся микропобегов. При увеличении концентрации БАП в среде до 5,0 мг/л коэффициент размножения резко возрастал (в 3–5 раз). Однако микропобеги, образовавшиеся в течение 3–4 недель культивирования, были слишком мелкими, тяжело отделялись от конгломерата, что обусловило значительные трудности при дальнейшей работе с культурой. При увеличении периода времени между пассажами до 5–6 недель побеги вытягивались, но были ослабленными и зачастую гипероводненными, что также вызывало сложности при дальнейшем культивировании. Последующее снижение концентрации БАП в питательной среде до 0,5 мг/л дало положительные результаты: коэффициент размножения был не ниже, чем при концентрации его 2,0 мг/л, а образующиеся микропобеги были крепкими и легко отделяющимися.

Для удлинения полученных микропобегов и их последующего укоренения использовалась питательная среда MS с уменьшенным содержанием макросолей и добавлением 1,0 мг/л индолилуксусной кислоты. После 3–4 недель культивирования подсчитывалось число укорененных регенерантов, а также измерялись их параметры (табл. 3).

Длина побега не зависела от того, культивировались ли микропобеги на среде с концентрацией макросолей $\frac{1}{2}$ или $\frac{1}{4}$ от нормы по Мурасиге–Скугу. Добавление в питательную среду кинетина в концентрации 0,2 г/л стимулировало удлинение корней, и число листьев на побег в этом варианте среды было большим, чем на аналогичной среде без добавления кинетина (10–12 при длине побега 22–25 мм). Уменьшение концентрации макросолей в среде до $\frac{1}{4}$ от нормы солей по Мурасиге–

Скугу не привело к снижению показателей параметров регенерантов, однако растения в этом случае были менее жизнеспособными, чем культивированные на среде с концентрацией макросолей $\frac{1}{2}$ от нормы по Мурасиге–Скугу, и частота ризогенеза оказалась меньшей. Таким образом, оптимальной средой для получения большего числа жизнеспособных регенерантов явилась питательная среда Мурасиге–Скуга с концентрацией макросолей, уменьшенной вдвое, с добавлением 1,0 мг/л индолилуксусной кислоты и 0,2 мг/л кинетина.

Таблица 3. Параметры регенерантов в зависимости от состава питательной среды для культивирования на этапе укоренения

Вариант ПС	Параметры регенерантов				Частота ризогенеза, %
	Длина побега, мм	Число корней, шт.	Длина корня, мм	Число листьев, шт.	
$\frac{1}{2}$ MS; ИУК = 1,0 мг/л	20,83±2,74	2,83±0,40	5,94±0,82	6,45±0,43	65,22±1,1
$\frac{1}{2}$ MS; ИУК = 1,0 мг/л; К = 0,2 мг/л	23,56±1,39	3,70±0,37	8,76±0,60	11,39±1,34	63,4±1,01
$\frac{1}{4}$ MS; ИУК=1,0 мг/л	20,56±2,70	4,86±0,63	5,12±0,27	9,86±0,77	58,3±1,09

Укорененные регенеранты высаживались в смесь земли с песком (1:1) и торфа в соотношении 3:1 под пленку и постепенно адаптировались к условиям теплицы. При этом выживаемость регенерантов составила порядка 90% (рис. 2).



Рис. 2. Регенерант ежевики «Торнфри», адаптированный к тепличным условиям

Выводы

Таким образом, в ходе исследований был подобран оптимальный вариант стерилизации эксплантов, было установлено, что полевой материал больше подвержен действию внутренней инфекции, чем тепличный, а также выявлено, что больший по размерам эксплант лучше развивается, однако труднее поддается стерилизации. Получена стабильно растущая стерильная культура для дальнейших исследований.

Список литературы

- Алешина Е. Н., Болдырева Я. А. Особенности введения двух видов *Janiperus* в культуру in vitro // The biology of Plant Cells in vitro and Biotechnology : Abstr. VIII Int. conf. Саратов : Изд-во Сарат. губ. торг.-пром. палаты, 2003. С. 33.
- Джигадло М. И., Колесникова А. Ф., Джигадло Е. Н. и др. Микрклональное размножение и производство посадочного материала плодовых и ягодных культур высших категорий качества // The biology of Plant Cells in vitro and Biotechnology : Abstr. VIII Int. Conf. Саратов : Изд-во Сарат. губ. торг.-пром. палаты, 2003. С. 109.
- Красовская Л. С. Рубус – *Rubus* L. // Флора восточной Европы. СПб. : Наука и техника, 2001. Т. 10. С. 362–393.
- Маевский П. Ф. Флора средней полосы европейской части России. М. : Товарищество научных изданий КМК, 2006. 600 с.
- Майорова Ю. А. Оптимизация этапов клонального микроразмножения гибридов вишни на основе применения новых биологически активных веществ : дис. ... канд. биол. наук. Краснодар, 2009. 133 с.
- Озеровский А. В. Микрклональное размножение селекционных форм ремонтантной малины с использованием новых регуляторов роста : дис. ... канд. биол. наук. Брянск, 2007. 123 с.
- Пат. 2128430 Российская Федерация, А01Н4/00. Питательная среда для микрклонального размножения черешни / Фардзинова И. М.; опубл. 10.04.1999.
- Пат. 2198505 Российская Федерация, А01Н4/00, С12N5/04. Питательная среда для регенерации растений абрикоса из незрелых зародышей / Фардзинова И. М.; опубл. 20.02.2003.

УДК 635.21:631.582.2:58.085

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ В ИНТРОДУКЦИИ ГЛАДИОЛУСА ГИБРИДНОГО

Т. Н. Шакина

*Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского
Учебно-научный центр «Ботанический сад»
410010, г. Саратов, ул. Академика Навашина
e-mail: shakinatn@rambler.ru*

Среди клубнелуковичных растений гладиолус гибридный – одна из наиболее подверженных различным заболеваниям цветочная культура. В наших климатических условиях гладиолус гибридный повреждается в основном тремя видами возбудителей: *Fusarium oxysporum* Schl. f. *gladioli* (Mass.) Sn. et Hans, *Botrytis gladiolorum* Timm, *Pseudomonas marginata* (Mc Cull.) Stapp, а также вирусами *Gladiolus mosaic virus* и *Yellow mosaic virus*. Повышенная восприимчивость растений к болезням осложняет введение в культуру данного клубне-