

УДК 634:631. 524.85:576.53:581.52

**ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ УСПЕХ ПЕРЕВОДА
МИКРОРАСТЕНИЙ В НЕСТЕРИЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ**

Муратова Светлана Александровна

кандидат биологических наук, профессор

smuratova@yandex.ru

Трунов Игорь Александрович

аспирант

Мелехов Игорь Дмитриевич

аспирант

Мичуринский государственный аграрный университет

г. Мичуринск, Россия

Аннотация. В статье обсуждаются основные проблемы адаптации микрорастений садовых культур, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям. Рассмотрены основные факторы, определяющие эффективность перехода микрорастений в условия *ex vitro*.

Ключевые слова: садовые культуры, клональное микроразмножение, микрорастения, адаптация.

Получение корнесобственных плодовых и ягодных растений методом клонального микроразмножения является важным компонентом в интенсификации сельскохозяйственного производства [26]. В развитых странах микроразмножение растений, начало распространяться еще в 60-е годы прошлого столетия, а сейчас оформилось как мощное промышленное производство, быстро реагирующее на запросы рынка.

Производством растений *in vitro* и доращиванием растений *in vivo* занимаются крупные коммерческие фирмы, которые имеют в собственности как биотехнологические лаборатории, так и теплицы для их адаптации и доращивания. На сегодняшний день признанными лидерами в этой области являются такие страны как Нидерланды, США, Индия, Израиль, Италия, Польша. В этих странах насчитывается более 300 коммерческих лабораторий, ряд из которых имеют производительность 15-20 млн. растений в год. В нашей стране пока нет ни одной фирмы с таким объемом производства микрорастений. Всего в мире методом клонального микроразмножения производят более 500 млн. растений в год.

Адаптация является ключевым этапом успешного размножения большинства растений *in vitro*. Только отработка эффективной технологии перевода микрорастений в нестерильные условия делает возможным промышленное микроразмножение садовых культур.

К важнейшим факторам, определяющим успешный переход микрорастений в нестерильные условия следует отнести:

1. *Влажность воздуха.* У растений, культивируемых *invitro*, нарушена деятельность устьичного аппарата, вследствие чего у них происходит потеря большого количества воды [22]. Есть данные, что интенсивность транспирации воды у растений, находящихся в культуральных сосудах, в 3 раза больше по сравнению с растениями, выращиваемыми при естественной влажности воздуха [14]. После пересадки в нестерильные условия микрорастения испытывают водный стресс, проявляющийся в обезвоживании тканей и в разрушении мембран. Особенно чувствительны растения к иссушению сразу после их

извлечения из культуральных сосудов. Уже спустя 40 минут после нахождения растений при относительной влажности воздуха 40% наблюдается потеря листьями более 40% воды, а в течение первых 15-30 минут - повреждение клеток [20]. Поэтому до высадки в почву микрорастения следует переносить в адаптационные помещения в закрытых контейнерах с небольшим количеством воды. В ряде случаев, например, при адаптации гейхеры, растения лучше из культуральных сосудов сразу высаживать в субстрат.

Многие исследователи рекомендуют первое время после высадки микрорастений в субстрат поддерживать влажность воздуха 95-99% постепенно, в течение 10-14 дней, снижать ее до 50-60%. Некоторые авторы советуют уменьшать влажность на 5% в день. Такую процедуру возможно провести в рамках эксперимента и крайне сложно в промышленных масштабах [25].

2. *Температура.* Оптимальная температура для высадки большинства видов растений на адаптацию +23-25 °С. Как пониженная, так и повышенная температура в первые недели адаптации крайне опасны для микрорастений. Постоянно пониженная температура (15-20 °С) в сочетании с высокой влажностью субстрата могут привести к тому, что микрорастения перейдут в состояние долговременного покоя, из которого их будет очень трудно вывести. Такой эффект наблюдали при адаптации разных видов актинидии. При высадке растений на адаптацию в почву в феврале месяце в пасмурные дни при отсутствии дополнительного освещения и температуре 18 °С, при регулярном орошении микрорастений происходило замокание субстрата, растения, подвергшиеся стрессу или погибали, или переходили в состояние физиологического покоя, из которого не выходили даже при оптимизации температурного и светового режима [16]. Температура в адаптационном помещении выше 40-45 °С в момент высадки в сочетании с высокой влажностью приведет к тому, что микрорастения просто «сварятся». Этот момент следует учитывать, если адаптация проводится в теплицах с нерегулируемым температурным режимом.

3. *Освещение.* На рост и развитие микрорастений в процессе адаптации большое влияние оказывают условия освещенности в теплице [21]. В культуральных помещениях биотехнологических лабораторий обычно поддерживается освещенность в пределах 3-3,5 тыс. люкс и фотопериод 16 ч. день/ 8 ч. ночь. В первое время после высадки интенсивность освещения рекомендуется поддерживать на том же уровне. Оптимальная освещенность среднего яруса климакамеры (температура 25-27°C и освещенность 3 тыс. лк.) способствовала развитию корневой системы и обеспечивала 100 %-ную адаптацию растений винограда [4]. Недостаточная освещенность подавляла рост и развитие растений, угнетенные растения полностью погибали через 2-3 недели. На рост и развитие растений влияет и спектральный состав света. Так, активному развитию растений ежевики на этапе адаптации способствовал красный свет с длиной волны 611-660 нм [24].

Следует исключить воздействие прямых солнечных лучей на микрорастения на начальном этапе адаптации, т.к. это может привести к ожогам листьев на которых будут капельки воды. Если адаптация проводится при естественном освещении для затенения микрорастений следует использовать сетчатые ширмы или укрывной материал типа «Спанбонд». В зависимости от длины светового дня в момент перевода микрорастений в нестерильные условия можно довольствоваться естественным освещением или использовать досветку лампами дневного света. При отрастании новых листьев в нестерильных условиях интенсивность освещения следует увеличивать, доводя постепенно до уровня естественного.

4. *Субстрат.* В технологии клонального микроразмножения на этапе адаптации наиболее часто используют субстраты, состоящие из следующих компонентов в различных соотношениях: перлит, торф, торф и песок (2:1), перлит и торф (1:1; 1:2; 1:3), сфагновый мох, сфагновый мох и вермикулит, торф, песок и хвойная земля (1:1:1), керамзит, цеолит [8, 13, 19, 3], кроме того, использовалось сочетание торфа и осадков городских сточных вод (ОГСВ) [1], последовательно в два этапа – стерильный кварцевый песок, затем смесь песок:

торф : дерновая земля (1:2:1) [11], смесь торф : дерновая земля : вермикулит в соотношении 1:3:3 и смесь дерновая земля и вермикулит (1:1) [17]. Ионообменные субстраты БИОНА были высокоэффективными при выращивании косточковых культур [9] и герберы [5].

Фитосанитарное состояние субстрата играет большую роль в приживаемости растений *ex vitro*. Заметное влияние на приживаемость винограда оказала стерилизация песка раствором перманганата калия [2]. Эффективны обработки субстрата горячим паром, 0,1% раствором бенлата, эупарена[7], противомикробными препаратами с добавлением терразола. Однако некоторые авторы говорят о несущественной разнице между использованием стерильного и нестерильного субстрата [6]. Для развития пробирочных растений земляники лучшим вариантом оказалась нестерильная смесь лесной почвы и песка (3:1) [12].

Положительный эффект дают минеральные внекорневые обработки пробирочных растений, например, минеральной основой среды МС [15], раствором кальциевой [23] или аммиачной селитры [4]. После того как микрорастения успешно приживались в почве, более интенсивному развитию саженцев способствовали корневые обработки растений микробиологическими препаратами [18, 16].

Существует достаточно много технологических схем перевода микрорастений в нестерильные условия. При том, что оборудованные климокамеры с регулируемыми параметрами освещения, температуры и влажности представляются идеальным вариантом для адаптации микрорастений, на практике в производственных условиях их используют достаточно редко вследствие высокой стоимости и сравнительно малого количества выращиваемых в них растений. При соблюдении основных необходимых физических параметров, обязательных для данного этапа, адаптацию микрорастений можно успешно провести, используя недорогие малогабаритные пленочные укрытия. Наличие зимних отапливаемых теплиц, где можно разместить эти парники значительно расширяет временные рамки

для прохождения этого этапа. Допустимая гибель микрорастений при соблюдении оптимальных условий адаптации составляет не более 5-10 %.

Список литературы:

1. Адаптация микрорастений малины (*Rubus L.*) и сирени (*Syringa L.*) к нестерильным условиям / О.Н. Аладина, С.В. Акимова, С.О. Дубровская [и др.] // Известия ТСХА. - 2009. – Вып. 3. - С. 98-110.

2. Батукаев, А.А. Совершенствование технологии ускоренного размножения винограда методом *in vitro* и применение регуляторов роста в условиях *in vitro* и *in vivo*: автореф. дис. д-ра с.-х. наук / А.А. Батукаев. - М., 1999. - 60 с.

3. Батукаев, А.А. Использование цеолита при адаптации и дорастивании растений винограда *in vitro* в условиях *in vivo* / А.А. Батукаев, М.А. Садаева // Пути интенсификации и кооперации в селекции садовых культур и винограда. – Краснодар, 2002. - С. 212-215.

4. Бьядовский, И.А. Оптимизация условий роста косточковых культур после микроразмножения: автореф. дис... канд. с.-х. наук / И.А. Бьядовский. - М., 2007. - 25 с.

5. Вайновская, И. Ф. Микрклональное размножение в культуре *in vitro* и адаптация герберы (*Gerbera hybrida*) / И. Ф. Вайновская, И. М. Чумакова, Н. М. Глушакова, Т. И. Фоменко // Сб.: Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: материалы III Всерос. науч.-практ. Конф.. – Волгоград: Изд-во AVATARS, 2010. – С. 183–188.

6. Высоцкий, В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала плодово-ягодных культур: автореф. дис д-ра с.-х. наук / В.А. Высоцкий. - М.,1998. — 44 с.

7. Гиголашвили, Т.С. Особенности водного режима *Solanum tuberosum L.* при микрклональном размножении: автореф. дис. канд. биол. наук / Т.С. Гиголашвили. - Минск, 1998. - 20 с.

8. Деменко, В.И. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям / В.И. Деменко, В.Г. Лебедев // Известия ТСХА. - М., 2011. – Вып.1. - С. 60 -70.

9. Кирина, И.Б. Ботаника: лечебное садоводство: учебное пособие / И.Б. Кирина, И.А. Иванова, Н.С. Самигуллина. - Москва: Изд-во Юрайт, 2019. - Сер. 68 Профессиональное образование (2-е изд.). - 164 с.

10. Муратова, С.А. Оптимизация состава питательных сред при клональном микроразмножении нетрадиционных ягодных культур / С.А. Муратова, Н.С. Субботина, Р.В. Папихин // Сб.: Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты): материалы VII Международной научно-практической конференции, посвященной 30-летию отдела биотехнологии растений Никитского ботанического сада, 2016. - С. 102-103.

11. Набиева, Ю.А. Биотехнологические приемы клонального микроразмножения перспективных сортов *Syringa vulgaris* L. для Западной Сибири / Ю.А. Набиева // Вестник ИРГСХА. – Молодежный: Изд-во ИГАУ им. А. А. Ежевского, 2011. – № 44(4). – С. 69–76.

12. Паскеев, Н.А. Совершенствование системы производства оздоровленного посадочного материала земляники в условиях Северного Кавказа: автореф. дис. канд. с.-х. наук / Н.А. Паскеев - Краснодар, 2001. – 27 с.

13. Плаксина, Т. В. Приемы адаптации растений-регенерантов к условиям *ex vitro* / Т.В. Плаксина // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. Садоводство. – Краснообск: Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, 2011. – № 2 (218). – С. 43–48.

14. Пугачёва, Г.М. Использование регуляторов роста при размножении лилий / Г.М. Пугачёва // Субтропическое и декоративное садоводство. - 2016. - № 56. - С. 121-125.

15. Селекция садовых культур: учебное пособие / Н.С. Самигуллина, Н.И. Савельев, С.Л. Расторгуев [и др.]. - Мичуринск, 2013. - 330 с.

16. Тарашвили, З.Т. Размножение черной и красной смородины *in vitro* / З.Т. Тарашвили, В.А. Высоцкий // Технология возделывания интенсивных садов и виноградников в Грузинской ССР. - Тбилиси, 1983. - С. 176-185.

17. Трунов, И.А. Оптимизация условий роста микрорастений садовых культур на этапе адаптации / И.А. Трунов, Ю.В. Хорошкова // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – 2020. - №1 (60). - С. 90-97.

18. Шакина, Т. Н. Опыт адаптации растений-регенерантов к условиям *ex vitro* некоторых декоративных и плодово-ягодных культур в Учебно-научном центре «Ботанический сад» Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского / Т.Н. Шакина // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2020. – Т. 19. - № 1. - С. 315-320.

19. Хорошкова, Ю.В. Влияние микробиологических биопрепаратов на развитие микрорастений ежевики на этапе адаптации / Ю.В. Хорошкова, С.А. Муратова // Сб.: Агрэкологические аспекты устойчивого развития АПК: материалы XVI Международной научной конференции. - Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2019. – С. 306-310.

20. Brainerd, K.E. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity/ K.E. Brainerd, L.H. Fuchigami // J. Am. Soc. Hort. Sci. - 1981. - V. 106. - № 4. - P. 515-518.

21. Donnelly, D. J. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil / D. J. Donnelly, W. E. Vidaver // J. Am. Soc. Hort. Sci. - 1984. - V. 109. - № 2. - P. 172-176.

22. Fuchigami, L.H. Abaxial Transpiration and Water Loss in Aseptically cultured plum / L.H. Fuchigami, T.V. Cheng // J. Am. Soc. Hort. Sic. - 1981. - Vol. 106. - № 4. - P. 519-522.

23. Orlicowska, T. Propagation of quince S1 *in vitro* / T. Orlicowska // Fruit Sc. Rep. Skiernilwice. - 1988. - V.5. - № 4. - P. 157-165.

24. Pierik, R.L. Sprenkels Micropropagation of Lilac (*Syringa vulgaris* L.) / R.L.M. Pierik, H.H.M. Steagmans, P.F. Sprenkels // *Biotechnology and Forestry*. - 1992. -V. 20. - P. 407-426.

25. Preece, J.E. The most tricky part of micropropagation: establishing plants in greenhouses and fields / J.E. Preece // *Comb. Proc. Intern. Plant Propagators' Soc.* – 2002. - Vol. 51. - C. 300-303.

26. Papikhin, R.V. The statistical analysis of cytomorphological traits in the distant apple and pear F1 and F2 hybrids (*Malus x pyrus*) from artificial and spontaneous outcrosses / R.V. Papikhin, M.L. Dubrovsky // *Digital agriculture - development strategy Proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019)*. Cep. «Advances in Intelligent Systems Research». - 2019. - C. 363-367.

UDC 634:631. 524.85:576.53:581.52

**MAIN FACTORS DETERMINING THE SUCCESS OF THE
TRANSFER OF MICROPLANTS TO NON-STERILE CONDITIONS**

Muratova Svetlana Aleksandrovna

Candidate of Biological Sciences, Professor
smuratova@yandex.ru

Trunov Igor Aleksandrovich

post-graduate student

Melekhov Igor Dmitrievich,

post-graduate student

Michurinsk State Agrarian University

Michurinsk, Russia

Annotation. The article discusses the main problems of adaptation of microplants of horticultural crops obtained in vitro to non-sterile conditions. The main

factors that determine the efficiency of the transition of microplants to ex vitro conditions are considered.

Key words: garden crops, clonal micro-propagation, micro-growth, adaptation.