



РАЗМНОЖЕНИЕ ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *in vitro*



НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Институт плодоводства

РАЗМНОЖЕНИЕ
ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ
РАСТЕНИЙ
В КУЛЬТУРЕ *in vitro*

Минск
«Беларуская навука»
2016

УДК 634-153(476)

Размножение плодовых растений в культуре *in vitro* / Н. В. Кухарчик [и др.] ; под общ. ред. Н. В. Кухарчик. – Минск : Беларуская навука, 2016. – 208 с. – ISBN 978-985-08-1952-9.

В монографии обобщены результаты многолетних исследований по размножению в культуре *in vitro* сортов и подвоев плодовых и ягодных культур, выращиваемых в Беларуси. Изложены общие вопросы работ со стерильной культурой растений и особенности выращивания *in vitro* конкретных генотипов яблони, груши, вишни, сливы, смородины черной и красной, крыжовника, малины летней и ремонтантной, ежевики, земляники садовой, голубики, брусники, клюквы, рябины, аронии черноплодной.

Предназначена для специалистов сельского хозяйства, преподавателей и студентов вузов.

Табл. 49. Ил. 143. Библиогр.: 363 назв.

А в т о р ы:

Н. В. Кухарчик, М. С. Кастрицкая, С. Э. Семенас, Е. В. Колбанова,
Т. А. Красинская, Н. Н. Волосевич, О. В. Соловей, А. А. Змушко, Т. Н. Божидай,
А. П. Рундя, А. М. Малиновская

Р е ц е н з е н т ы:

член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук,
профессор Ж. А. Рупасова
доктор биологических наук, доцент О. В. Морозов

ISBN 978-985-08-1952-9

© Институт плодородства
НАН Беларуси, 2016
© Оформление. РУП «Издательский
дом «Беларуская навука», 2016

ВВЕДЕНИЕ

Потребность в высококачественных, свободных от патогенных вирусов саженцах для закладки базовых, маточных коллекций, а также промышленных плантаций в настоящее время велика. Одним из способов быстрого размножения сортов плодовых и ягодных растений является использование культуры изолированных тканей *in vitro*. Одновременно с этим наиболее перспективные способы оздоровления от вирусов основаны также либо на использовании непосредственно культуры тканей *in vitro* (апикальная меристема), либо на сочетании термотерапии и хемотерапии с культурой *in vitro*. Разработка и адаптация методик микроразмножения *in vitro* и последующего выращивания микрорастений *ex vitro* к сортименту плодовых и ягодных растений Беларуси позволяет не только своевременно размножить единичные экземпляры, но и включать технику *in vitro* в процесс оздоровления, депонирования, защиты от реинфицирования и безопасного обмена растительным материалом.

С другой стороны, необходимость разработки методик микроразмножения определяется тем, что использование культуры *in vitro* в тиражировании плодовых и ягодных растений должно обеспечивать, кроме высокого коэффициента размножения, близкую к традиционным методам получения посадочного материала генетическую стабильность растений.

Третьей составляющей, определяющей актуальность исследований, является перспективность создания генобанков вегетативно размножаемых культур с использованием, в том числе, криоконсервации, поскольку регенерация растений после длительного хранения базируется именно на этих методиках.

Главной целью данной работы явилось обобщение методик микроразмножения, основанных на традиционных путях воспроизводства растений в естественных условиях, разработанных и адаптированных нами к белорусскому сортименту плодовых и ягодных растений.

Сотрудники отдела биотехнологии признательны коллегам с Научно-практического центра НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству, с Гомельской и Брестской ОСХОС НАН Беларуси, Гродненского зонального института растениеводства НАН Беларуси, Института защиты растений, биологического факультета БГУ, Белорусской государственной сельскохозяйственной академии за совместную работу и апробацию результатов исследований.

Авторы выражают благодарность кандидату сельскохозяйственных наук, первому руководителю лаборатории Малюкевич Майе Петровне, сотрудникам: Фоминой Елене Георгиевне, Жук Наталье Глебовне, Круглеевскому Михаилу Александровичу, Гашенко Ольге Александровне; огромную благодарность за совместную работу агрономам, лаборантам и инженерам отдела: Холохоренко Нелли Брониславовне, Гузей Марии Петровне, Найловец Нине Иосифовне, Тупичкиной Елене Геннадьевне, Кухаревой Клавдии Васильевне, Горбач Марии Михайловне, Умецкой Тамаре Александровне, Хрипач Светлане Славовне, Пивоварчик Инне Александровне, Савостиной Наталье Николаевне, Кирченко Анне Владимировне, Колядко Оксане Сергеевне, Бредневу Александру Александровичу, Подобеду Александру Владимировичу, Дедюле Валерию Антоновичу.

ПРИМЕНЕНИЕ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO* В РАБОТЕ С ПЛОДОВЫМИ И ЯГОДНЫМИ РАСТЕНИЯМИ

В настоящее время использование культуры тканей и органов *in vitro* имеет широкие перспективы и является частью большого перечня технологических операций в сельском хозяйстве. В плодоводстве культура тканей *in vitro* используется при:

освобождении от системных патогенов (вирусов, фитоплазм, бактерий), как отдельно, так и в комплексе с хемо- и термотерапией *in vitro*;

массовом размножении посадочного материала;

депонировании генотипов при нормальной и минимальной вегетации, создании коллекций;

регенерации растений после криоконсервации;

ускоренном размножении единичных экземпляров хозяйственно-полезных генотипов;

обмене растительным материалом с минимальными затратами на подтверждение карантинного соответствия.

Освобождение от системных патогенов. Основными способами формирования безвирусных коллекций плодовых и ягодных растений являются фитосанитарный отбор и последующее выделение здоровых растений из имеющихся насаждений, а также различного рода терапевтические мероприятия – оздоровление от вирусов в культуре апикальных меристем, термотерапия, хемотерапия и получение высококачественного маточного материала для дальнейшего вегетативного размножения растений. Выбор того или иного метода формирования коллекций основан на степени зараженности вирусами культур и сортов растений. При возможности прямого выделения безвирусных растений у плодовых и ягодных культур, оздоровление (как более дорогостоящее) не применяется.

В тоже время большинство маточных насаждений клоновых подвоев плодовых культур, земляники садовой и других ягодных растений в странах Западной Европы выращены с применением культуры *in vitro*, или оздоровлены с использованием апикальных меристем, термотерапии и хемотерапии. Это значительно снизило уровень инфицированности вирусными и вирусоподобными патогенами маточных и промышленных насаждений и уменьшило риск повторного инфицирования здоровых растений [1–5].

Метод оздоровления с использованием культуры апикальных меристем в настоящее время наиболее перспективный и эффективный с фитосанитарной

и фитотерапевтической точек зрения, так как обладает определенной универсальностью. Использование культуры изолированных апексов приводит к комплексному оздоровлению растений, позволяет в значительной степени освободиться от вирусных, бактериальных, грибных заболеваний и нематодных инвазий [6–10]. Элиминация вирусных болезней методом культуры меристем является, по-прежнему, одним из самых интересных направлений применения культуры ткани *in vitro*.

Основной причиной возможности оздоровления растений от вирусных инфекций методом культивирования меристематических верхушек P. Vohus и P. Druart [11] считают наличие градиента концентрации вирусных частиц в тканях растений. Количество вирусов в растении увеличивается в направлении от молодой ткани к старой, а апикальные ткани зараженных вирусами растений практически не содержат вирусных частиц и, соответственно, не передают их при введении в культуру *in vitro*.

По мнению В. А. Высоцкого [6], освобождение растений от вирусов имеет несколько предположительных механизмов: отсутствие в зоне апикальной меристемы проводящей системы, что обеспечивает снижение скорости распространения вирусов в меристематических клетках; ингибирование репликации вирусов биологически активными веществами ауксиновой, цитокининовой или иной природы, находящимися в питательной среде; ингибирование вирусов в процессе культивирования на питательных средах; взаимодействие всех вышеназванных механизмов элиминации вирусных частиц.

Электронно-микроскопические исследования показали наличие для каждой пары взаимодействующих компонентов «растение–вирус» характерного апикального иммунитета, который и определяет оптимальный размер выделяемого экспланта: от 0,1–0,3 мм, если только самые крайние клетки не содержат вирус, до 0,5–3,0 мм, если «чистая» зона является достаточно крупной [12–14].

В то же время существует возможность получения безвирусных растений из клеток, содержащих вирус. В качестве возможных версий оздоровления тканей, содержащих вирусы, рассматривается возможное соперничество при синтезе нормальных и вирусных нуклеотидов, присутствие экзогенных ингибиторов в питательной среде и метаболический разрыв, происходящий из-за повреждения клеток при выделении экспланта [12, 14].

Степень успеха в элиминации вируса непосредственно связана с размером выделяемых эксплантов. L. Navarro [15] достиг 100% уничтожения вирусов, когда выделял апекс не более чем с двумя листовыми примордиями (0,1–0,15 мм). Авторы также указывают на различную эффективность культивирования апикальных меристем различных видов при освобождении от разных вирусов. Так, при замене термотерапии винограда (эффективность устранения вирусов – 27,3%) на культуру меристем, в среднем 80,4% регенерировавших растений оказывались свободными от вирусов [16]. Результативность при оздоровлении персика от вируса Шарки и от вируса некротической кольцевой пятнистости – 72 и 57% соответственно. P. Vohus и P. Druart [11] показали, что успех в элими-

нации вирусов больше зависит от вируса, чем от вида растения. На различную степень элиминации вирусов у разных растений указывают и другие авторы. М. Barda, L. Martino, F. Lauretti [17] отмечают, что клональное микроразмножение с успехом применяется для элиминации PPV, ACLSV, PDV, PNRV, АрMV из растений сливы, персика и миндаля различных сортов, однако является неодинаково эффективным методом при освобождении разных растений от определенных вирусов.

Необходимо отметить, что и при использовании культуры *in vitro* эффект оздоровления от вирусов достигается не всегда. Основными причинами, определяющими неполное удаление вирусов, являются слишком маленькая зона апикального иммунитета для пары растение–вирус, недостаток дифференцирования в течение культуры ткани апексов малых размеров, слабое укоренение растений после культуры *in vitro*. Две последние причины определяются недостаточной разработанностью методических рекомендаций по культивированию видов *in vitro*. Но в целом выращивание посадочного материала с использованием культуры апикальных меристем позволяет в значительной степени оздоровить получаемый посадочный материал плодовых и ягодных растений. По мнению И. В. Жарковой [5], только применение оздоровления земляники методом верхушечных меристем дало увеличение урожайности в среднем на 20%.

Исследования J. M. Deogratias с соавторами [18] показывают, что можно устранить вирусы черешни путем длительного культивирования *in vitro* на среде, богатой гормонами. Возможно, гормональная насыщенность культуральной среды увеличивает конкурентоспособность клетки в борьбе с вирусом.

Об успешном применении апикальных меристем в освобождении плодовых растений от вирусов сообщают W. Hurt, H. Krczal, L. Kunze [19] (яблоня), J. Vertesy [20] (персик).

Депонирование генотипов при нормальной и минимальной вегетации, создание коллекций. Депонирование сортов и гибридов плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro* используется для:

создания коллекций генотипов и длительного их хранения на минимальных площадях;

предотвращения реинфицирования оздоровленных коллекций и, соответственно, сокращения периодических тестирований на зараженность вирусами;

массового размножения растений с использованием микроразмножения, исключая самый медленный этап – введение в культуру *in vitro*;

обмена растительным материалом с минимальными затратами на подтверждение карантинного соответствия;

периодического возобновления коллекций *ex vitro*.

В зависимости от температур выделяются длительное культивирование при температурах, обеспечивающих нормальную вегетацию растений (+20 – +25 °С); хранение при пониженных температурах, обеспечивающих минимальную вегетацию (+5 – +8 °С).

Хранение коллекций в условиях минимальной вегетации *in vitro* характеризуется сведением к минимуму числа пассажей, снижением темпов роста и старения культуры. Для того чтобы избежать частых пересадок растений *in vitro*, используются условия, которые, с одной стороны, ограничивают рост регенерантов, с другой – обеспечивают высокую сохранность и способность к росту, размножению и укоренению после окончания периода депонирования.

Массовое размножение посадочного материала. Для многих ягодных растений и клоновых подвоев отмечено значительное увеличение вегетативной продуктивности после прохождения растений через культуру *in vitro*, без других оздоровительных процедур. Отмеченная закономерность согласуется с многолетними исследованиями зарубежных ученых и практическими результатами.

Использование современных технологий массового тиражирования растений на искусственных питательных средах, в том числе биореакторов, искусственных субстратов и т. д., приводит к тому, что себестоимость размножаемых *in vitro* растений снижается и, с учетом высокого качества получаемой продукции, ее цена устраивает покупателя.

Размножение на основе индукции прямого органогенеза из тканей материнского растения является наиболее перспективным при размножении *in vitro*, а наиболее удобным объектом для прямого органогенеза служат вегетативные почки растений, поскольку именно в них содержатся основные зачатки органов растений, представленные наименее специализированной меристематической тканью. Вегетативные почки могут вводиться *in vitro* как целыми с почечными чешуями и без, на одревесневших и недревесневших черенках, так и в виде изолированных меристем.

Органогенез растения в культуре *in vitro* при этом происходит практически так же, как *in vivo*, за исключением того, что с повышением в культуре *in vitro* концентрации веществ цитокининовой группы, по сравнению с естественной в растении, инициируется развитие не только верхушечной меристемы, но и конгломерата микропобегов. Снятие апикального доминирования путем формирования побегов с относительно укороченными междоузлиями, инициация развития пазушных почек и меристематических бугорков, которые дают начало новым побегам, рекультивируемым с теми же результатами, является наиболее универсальной моделью прямого органогенеза *in vitro*, и имеет хорошую воспроизводимость в пределах широкого набора видов растений. Метод является наиболее надежным при производстве посадочного материала плодовых и ягодных культур *in vitro*. Тем не менее каждая культура в процессе органогенеза имеет свои особенности и предъявляет определенные требования к составу питательных сред по минеральным компонентам, углеводам, фитогормонам и их концентрациям, физическим условиям культивирования на различных этапах.

С технической точки зрения, процесс размножения плодовых и ягодных культур *in vitro* можно разделить на несколько этапов: изоляция и стерилизация

экспланта, создание условий для его роста на питательной среде (т. е. инициация культуры *in vitro*); максимальное увеличение количества микрорастений, (собственно микроразмножение); укоренение размноженных побегов; возврат растений из условий *in vitro* в условия *ex vitro* (адаптация регенерантов).

Промышленное использование методов культуры ткани для вегетативного размножения растений впервые начато более 30 лет назад. G. Morel [21] применил вегетативное размножение *in vitro* орхидей взамен семенному размножению. В настоящее время с использованием метода клонального микроразмножения (культуры ткани и клетки) в мире получают более 200 миллионов растений в год. Особенно широкое распространение микроразмножение получило у декоративных, затем плодовых деревьев и ягодных кустарников. В странах ЕС количество лабораторий, занимающихся промышленным размножением плодовых растений за последнее время значительно увеличилось и достигло по *Prunus* – 57; *Fragaria* – 19; *Malus* – 18; *Actinidia* – 17; *Rubus* – 16 [22, 23].

Литература

1. Effect of *in vitro* propagation on field performance of two strawberry cultivars / S. N. Nehra [et al.] // *Euphytica*. – 1994. – Vol. 76. – P. 107–115.
2. Cameron, J. S. Enhanced vigor in vegetative progeny of micropropagated strawberry plants / J. S. Cameron, J. F. Hancock, J. A. Flore // *Hort. Sci.* – 1986. – Vol. 21. – P. 1225–1226.
3. Cameron, J. S. The field performance of strawberry nursery stock produced originally from runners of micropropagation / J. S. Cameron, J. F. Hancock, T. M. Nourse // *Adv. Strawberry product.* – 1985. – Vol. 4. – P. 56–58.
4. Составляющие потенциала возможной продуктивности маточных растений земляники / Н. Ю. Джуря [и др.] // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Москва, 20–22 ноября 2001 г. / Рос. Акад. с.-х. наук. ВСТИСП. – М., 2001. – С. 113–117.
5. Жаркова, И. В. Микроразмножение земляники // Интенсификация возделывания ягодных культур: межвуз. сб. науч. тр. / Ленингр. с.-х. ин-т. – Л., 1988. – С. 41–45.
6. Высоцкий, В. А. Культура изолированных тканей и органов плодовых растений: оздоровление и микроразмножение / В. А. Высоцкий // *С.-х. биология*. – 1983. – № 7. – С. 42–46.
7. Осипов, Ю. В. Производство оздоровленного посадочного материала земляники / Ю. В. Осипов, М. И. Джигадло // *Плодовое хозяйство*. – 1987. – Т. 5. – С. 20–21.
8. Приходько, Ю. Н. Совершенствование технологии оздоровления яблони от латентных вирусов / Ю. Н. Приходько, Д. Н. Редин., В. И. Кашин // *Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ / ВСТИСП* – М., 2000. – Т. VII. – С. 89–101.
9. Высоцкий, В. А. Клональное микроразмножение и оздоровление растений и декоративных кустарников / В. А. Высоцкий // *Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве: сб. науч. тр. / ВНИИС им. И. В. Мичурина*. – Мичуринск, 1989. – С. 3–8.
10. Walkey, D. G. A. Production of virus-free plants / D. G. A. Walkey // *Applied Plant Virology*. John Wiley & Sons: New York. – 1991. – P. 270–292.
11. Boxus, P. Chapter II Virus-Free Trees Through Tissue Culture / P. Boxus, P. Druart // *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. – 1986. – Vol. 1. – P. 24–30.
12. Mellor, F. C. Development of excised potato buds in nutrient culture / F. C. Mellor, R. Stace-Smith // *Can. J. Bot.* – 1969. – Vol. 47. № 10. – P. 1617–1621.

13. Spiegel, S. Recent Developments in Therapy and Virus-Detection Procedures for International Movement of Clonal Plant Germ Plasm / S. Spiegel, E. A. Frison, R. H. Converse // The American Phytopathological Society Plant Disease. – 1993. – Vol. 77, № 12. – P. 176–180.
14. Stace-Smith R. Virus-free clones through plant tissue culture // Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture, and Medicine / M. Moo-Young (ed.), Oxford, England. Pergamon Press. – 1985. – P. 69–179.
15. Navarro, L. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species / L. Navarro // Acta Hort. – 1988. – V. 227. – P. 43–55.
16. Bariass, M. Elimination of stem pitting and corky bark disease from grapevine by fragmented shoot apex culture / M. Bariass // Ann. Appl. Biol. – 1987. – № 110. – P. 653–656.
17. Barda, M. Comparison of different methods to produce virus free stone fruits / M. Barda, L. Martino, F. Lauretti // Acta Horticulture. – 1992. – № 309. – P. 385–392.
18. Deogratias, J. M. Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic ringspot virus, and apple chlorotic leaf spot virus in sweet cherries by a combination of chemotherapy, thermotherapy, and *in vitro* culture / J. M. Deogratias, F. Dosba, A. Lutz // Can. J. Plant Pathol. – 1989. – Vol. 11, № 4. – P. 337–342.
19. Hurt, W. H. Jahresber. Biol. Bundesanst. Land – und Forstwirtschaft / W. Hurt, H. Krczal, L. Kurze // Berlin und Braunschweig, 1979. – S. 60.
20. Vertesy, J. Plant Virology / J. Vertesy // Proc. 9th Conf. CS Plant Virologists. – Bruno. – 1981. – S. 197–200.
21. Morel, G. 1964 Tissue culture; a new means of clonal propagation of orchids / G. Morel // Orhid Soc. Bull. – Vol. 31. – P. 473–478.
22. Reuther, G. Current status and future prospects of large scale micropropagation in commercial plant production / G. Reuther // Food Biotechnology, 1990. P. 445–459.
23. Reuther, G. Comparative anatomical and physiological studies with ornamentals plants under *in vitro* and greenhouse conditions / G. Reuther // Acta Horticulturae. – 1988. – P. 91–98.

ОБЩИЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ

2.1. Оборудование лаборатории и организация работ

Для оптимальной организации работ используются следующие помещения:

1. **Ламинарная комната.** Отдельное помещение с легко моющимися поверхностями стен и пола, оборудованное ламинарными столами, бактерицидной ультрафиолетовой лампой и бинокулярным микроскопом.

2. **Комната для приготовления питательных сред.** Необходимо следующее оборудование: дистиллятор, бидистиллятор; водяная баня, электроплитки или СВЧ-печь; магнитные или механические мешалки; рН-метр; весы (диапазоном 1–20 г); лабораторная посуда (химические стаканы, колбы, мерные цилиндры, пипетки, пробирки и др.), холодильники.

3. **Комната для мытья посуды,** оборудованная мойками, сухожарным шкафом для сушки посуды, посудомоечной машиной, бойлером.

4. **Автоклавная комната,** оснащенная минимум тремя автоклавами (для стерилизации питательных сред, инфицированного материала и субстрата).

5. **Климатические комнаты** с оборудованием, предназначенным для поддержания благоприятного микроклимата: стеллажами с освещением, кондиционерами, вентиляторами, программным реле времени.

7. **Теплицы стеклянные,** предназначенные для второго этапа адаптации и размножения растений.

9. **Холодильные камеры** для хранения реактивов и депонирования растительного материала.

Необходимым условием при выполнении работ по клональному микроразмножению является соблюдение чистоты, а при приготовлении сред и, особенно, при работе в ламинаре – правил асептики. Все помещения независимо от вида выполняемых работ должны периодически обрабатываться антисептиками. Ламинар-боксы дополнительно перед началом работы облучаются бактерицидными лампами, затем протираются этиловым спиртом. Все предметы, находящиеся в ламинаре, в том числе бинокулярный микроскоп и штативы, облучаются бактерицидной лампой и протираются спиртом (70%-ный этиловый спирт), а инструменты дополнительно обжигаются в пламени спиртовки.

Условия культивирования растений *in vitro*: освещение 2,5–3 тыс. люкс, температура 21–23 °С, фотопериод 16/8 ч. Длительность субкультивирования 4 недели (если не приведены другие сроки). Растения культивируют в пробирках размером 220×22 мм, с объемом питательной среды 10 мл, в банках

объемом 300 и 500 мл, с объемом питательной среды 30 и 50 мл соответственно. Введение в культуру *in vitro* проводится в пробирки 160×16 мм с объемом питательной среды 5 мл.

Приготовление сред, стерилизация вспомогательного материала проводится по общепринятой методике [1–4]. Стерилизация сред ведется при давлении 0,9–1 атм. в течение 15 мин.

2.2. Отбор и выделение эксплантов для введения *in vitro*

Наиболее трудоемкими этапами культивирования растений с применением техники *in vitro*, являются переходные стадии *in vivo* – *in vitro* – *ex vitro*. Основные проблемы перевода растений *in vitro* связаны с необходимостью освобождения от патогенных микроорганизмов без повреждения тканей эксплантов, с последствиями нарушения систем питания и выделения изолированных частей растений. До настоящего времени при масштабном размножении сортов предпочтение отдается ежегодному введению эксплантов *in vitro* – для сокращения количества пассажей, снижения риска мутабельности и других аномалий, возникающих в результате длительного культивирования на искусственных питательных средах. Из основных факторов, влияющих на эффективность инициации культуры *in vitro*, можно выделить размер первоначального экспланта, период изоляции, местоположение экспланта на исходном растении, состав питательных сред. Однако, как показали исследования, немаловажное значение имеют косвенные факторы, не зависящие от физиологического состояния экспланта – в том числе, система стерилизации, скорость и качество выделения экспланта. Разработка эффективных систем стерилизации вводимых *in vitro* эксплантов является первоочередной задачей при использовании микроразмножения в промышленной биотехнологии.

Особенности стерилизации эксплантов при инициации культуры in vitro. Стерилизующий агент должен полностью удалять патогенную микрофлору с поверхности тканей растений и, одновременно, минимально повреждать клетки растений, по своей структуре сходных с клетками патогенов. Покровные ткани всех органов растений инфицированы различными группами патогенных микроорганизмов, внутренние – как правило, стерильны. В идеале, стерилизующее вещество, полностью убивая патогены, должно оставаться интактным к растительным тканям, легко удаляться с них, не оказывая токсического действия напрямую и через питательную среду. Одним из наиболее важных условий для всех стерилизующих веществ является его способность хорошо смачивать поверхность тканей и легко смываться дистиллированной водой. В противном случае наблюдается ожог и некроз тканей.

Для поверхностной стерилизации растительных тканей имеется большой набор химических соединений, они делятся на две большие группы: вещества, содержащие активный хлор (хлорамин, гипохлорит натрия и кальция, хлорная известь); вещества, содержащие ртуть (двуххлористая ртуть – сулема,

мертиолат, диоксид), а также представлены нитратом серебра (AgNO_3), перекисью водорода (H_2O_2), бромом (Br_2) и др.

Использование одного стерилизующего вещества, как правило, не обеспечивает освобождение эксплантов от комплекса грибных и бактериальных патогенов. Для эксплантов всех изученных плодовых и ягодных культур необходимо применение комплексной многоступенчатой стерилизации, включающей несколько стерилизующих агентов и ряд промывок для их удаления.

Оптимальным для введения *in vitro* меристем плодовых и ягодных культур является следующая последовательность работ при стерилизации, незначительно изменяющаяся для различных культур:

промывка вегетативных почек с кроющимися чешуйками под проточной водой;

удаление кроющихся чешуек;

промывка в бактерицидном и/или фунгицидном растворе и вновь проточной водой;

обработка 70%-ным этиловым спиртом;

основная стерилизация;

вымывание стерилизующего агента путем трехкратной промывки в стерильной воде;

выделение меристем в стерильных условиях [5–8].

В качестве бактерицидного и фунгицидного раствора для предварительной стерилизации различных культур успешно используется хлорамин, Белизна, Бенлат, Физан, для увеличения проницаемости наружных покровов и предварительной стерилизации – 70%-ный этанол. В качестве основной стерилизации наиболее приемлема обработка вводимых эксплантов 30%-ной перекисью водорода, 0,1%-ным раствором сулемы и 0,1%-ным раствором нитрата серебра, 0,01%-ным раствором мертиолата [5–9].

Уровень стерильности введенных в культуру *in vitro* меристем, при условии использования лучших систем стерилизации, достаточно высок для всех плодовых и ягодных культур (не менее 75%) и может обеспечить хорошие результаты в массовом микроразмножении большого количества сортов [5–9].

Введение *in vitro* меристематических верхушек предполагает достаточно длительный период инициации начала роста и развития меристемы в пригодный для микроразмножения конгломерат (1–2 месяца), наличие специального оборудования и высококвалифицированного персонала, а также требует больших затрат времени на стабилизацию культуры. Поэтому интерес представляют и ускоренные методы введения в культуру *in vitro* – посадка на питательные среды черенков и вегетативных почек. Метод введения в культуру *in vitro* крупных эксплантов может являться наиболее перспективным при размножении свободных от вирусов растений, а также при необходимости размножения редких генотипов без учета их фитосанитарного статуса.

Основной проблемой при посадке на искусственные питательные среды крупных эксплантов является обеспечение их стерильности, что предпола-

гает использование комплексных, жестких способов стерилизации; так, для черенков, наряду с обработками 70%-ным этанолом и 0,1%-ной сулемой, перспективным оказался обжиг побегов в пламени спиртовки после обработки 96%-ным этанолом.

При введении в культуру *in vitro* крупных эксплантов смородины черной (черенок, почка) использованы те же методы стерилизации, что и для меристемы, по окончанию которых проводился обжиг эксплантов, обработанных 96%-ным этанолом. При этом отмечается высокое количество некротировавших эксплантов (для черенков – 51,0%, почек – 47,8%), что связано с введением дополнительных стерилизующих агентов, проникновением их внутрь тканей, и выделением растением в питательную среду, вследствие гибели клеток, веществ фенольной природы [10].

Влияние размера выделяемого экспланта на инициацию культуры in vitro. Как показано выше, для плодовых и ягодных культур возможно введение *in vitro* различных типов эксплантов: одревесневших и зеленых черенков, вегетативных почек, апикальных меристем. У всех перечисленных эксплантов объектом микроразмножения является конус нарастания вегетативной почки, отличающийся размерами и количеством вегетативных почек и их зачатков. Размер выделяемого экспланта определяется в первую очередь целью культуральных работ. Чем меньше внимания уделяется вопросам оздоровления, тем крупнее могут быть вводимые *in vitro* экспланты. Это относится как к микроразмножению свободных от вирусов растений, так и к сохранению и размножению редких экземпляров, в том числе ценных гибридных форм. В связи с этим при подготовке методик микроразмножения плодовых и ягодных культур для промышленного использования, перспективным является включение таких элементов, как использование разных типов эксплантов.

Максимальная результативность инициации культуры *in vitro* для большинства культур отмечается при посадке на питательные среды меристем. Невысокая результативность использования однолетнего прироста обусловлена, как правило, неверно подобранной стерилизацией, в результате чего отмечается повышение количества инфицированных и некротировавших эксплантов [8].

Положительный эффект от использования крупных эксплантов определяется простотой посадки черенков в пробирки, использованием дешевых составов питательных сред (без биологически активных веществ и агара) наличием на вводимом черенке от 5 до 10 почек, высокой скоростью пробуждения почек и активной пролиферацией их в последующих пассажах. Необходимо также отметить, что при развитии крупных эксплантов на питательных средах всегда отмечается прямой органогенез, отсутствует дедифференциация тканей, что особенно важно при использовании культуры *in vitro* в масштабном микроразмножении сортов. При использовании для введения в культуру *in vitro* черенков и вегетативных почек отмечается быстрое начало роста эксплантов. Почки на черенках и выделенные почки набухают через 7–9 дней, через 14–17 дней появляются микропобеги, пригодные для пересадки и полу-

чения конгломератов, а через 21–25 дней после первой пересадки образуются пригодные к черенкованию конгломераты из 10–30 микропобегов.

При введении в культуру *in vitro* черенков и вегетативных почек крыжовника, ежевики, вишни, черешни, через 25–40 дней после посадки черенков на жидкие питательные среды *in vitro* коэффициент размножения составлял 3–10. При использовании апикальной меристемы через 35–40 дней наблюдалось только начало закладки микропочек на экспланте. Формирование микро-растений из меристем происходило только в течение последующего пассажа, причем в течение первых пассажей наблюдался, как правило, незначительный коэффициент размножения.

Несмотря на то, что максимальное количество жизнеспособных эксплантов отмечалось при введении в культуру *in vitro* меристематических верхушек, результативность инициации культуры *in vitro* с учетом фактора времени часто оказывалась выше при посадке черенков. Так, на вводимом в культуру *in vitro* черенке смородины черной обычно имеется до 10 вегетативных почек, поэтому реальную результативность инициации культуры *in vitro* показывал расчет коэффициента введения – отношения количества пересаженных эксплантов в первом пассаже (K_1) к количеству эксплантов (меристема, почка, черенок) в 0 пассаже (K_0), т. е. $K = K_1/K_0$. Так, коэффициент введения для меристемы равен 0,75, для почки – 0,23, для черенка – 0,64. Меристемы смородины черной, введенные в культуру *in vitro*, в первом пассаже не готовы к микроразмножению, в то время как почки, срезанные с черенков, имеют коэффициент размножения 1,4–1,9 соответственно. Во втором пассаже коэффициент размножения для почек, срезанных с черенка, составлял $3,7 \pm 0,51$, а для меристем – $1,06 \pm 0,02$ [5, 10, 11]. Хорошие результаты получены и при введении в культуру *in vitro* однолетних черенков других изучаемых культур вишни, черешни, сливы, алычи. Наименее перспективным оказалось введение в культуру *in vitro* вегетативных почек. Коэффициент введения при таком способе посадки был минимальным, уровень инфицированности и выделения фенолов – близким к таковому при посадке черенков, затраты труда и состав питательных сред сопоставимы с введением *in vitro* меристем [8].

Таким образом, исходные растения плодовых и ягодных культур для заготовки материала отбирали с учетом сортовых и фитосанитарных сертификатов, помологических признаков, отсутствия поражения болезнями и вредителями.

Введение в культуру *in vitro* проводили в течение года, как в период активного роста, так и в период покоя и фазу выхода вегетативных почек из периода покоя.

В культуру вводились однолетние одревесневшие и недревесневшие черенки с 7–10 почками, терминальные и латеральные вегетативные почки (с покровами и без них, с участком коры и без), точки роста с 1–3 парами при-мортиальных листочков и меристематические верхушки.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава 1. Применение культуры <i>in vitro</i> в работе с плодовыми и ягодными растениями (Кухарчик Н. В.).....	5
Глава 2. Общие методические разработки (Кухарчик Н. В.).....	11
2.1. Оборудование лаборатории и организация работ	11
2.2. Отбор и выделение эксплантов для введения <i>in vitro</i>	12
2.3. Питательные среды	16
2.4. Микроразмножение и укоренение плодовых и ягодных культур <i>in vitro</i>	20
2.4. Адаптация растений-регенерантов <i>ex vitro</i>	22
Глава 3. Земляника садовая (Семенов С. Э.).....	33
Глава 4. Смородина черная (Колбанова Е. В.)	58
Глава 5. Смородина красная (Колбанова Е. В., Малиновская А. М.).....	72
Глава 6. Крыжовник (Колбанова Е. В.)	81
Глава 7. Малина (Волосевич Н. Н., Рундя А. П.).....	88
Глава 8. Голубика, брусника, клюква (Божидай Т. Н.).....	113
Глава 9. Малораспространенные культуры (Кастрицкая М. С., Кухарчик Н. В., Малиновская А. М.)	131
9.1. Рябина садовая	131
9.2. Арония черноплодная	135
Глава 10. Сорты вишни (Красинская Т. А.).....	144
Глава 11. Клоновые подвой плодовых культур (Семенов С. Э., Змушко А. А., Кастрицкая М. С., Соловей О. В., Красинская Т. А., Кухарчик Н. В.).....	163
11.1. Клоновые подвой яблони	163
11.2. Клоновые подвой груши	176
11.3. Клоновые подвой сливы и алычи.....	179
11.4. Клоновые подвой вишни и черешни.....	185
Заключение	204
Термины, определения и сокращения	205

Научное издание

Кухарчик Наталья Валерьевна
Кастрюцкая Манана Сергеевна
Семенов Светлана Эдуардовна и др.

**РАЗМНОЖЕНИЕ ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ РАСТЕНИЙ
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Редактор *Т. С. Климович*
Художественный редактор *Д. А. Комлев*
Технический редактор *О. А. Толстая*
Компьютерная верстка *Ю. А. Аггейчик*

Подписано в печать 20.01.2016. Формат 70×100¹/₁₆. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 17,06+2,11 вкл. Уч.-изд. л. 15,2. Тираж 120 экз. Заказ 15.

Издатель и полиграфическое исполнение:
Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя
печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск.