УДК 630*232.414.4

М. А. Иванова, мл. науч. сотрудник; И. М. Баландина, науч. сотрудник
(ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»)

# ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА НА ВЫРАЩИВАНИЕ МИКРОКЛОНАЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ ОСИНЫ В УСЛОВИЯХ *EX VITRO*

One of convenient variants of mass reception of a landing material in a forestry is the method micropropagation of wood cultures. At carrying over of plants to unsterile they test stress and there is a destruction of regenerants. There are various ways of decrease in destruction of regenerants at an adaptation stage. The given work has been devoted influence of height of a landing material on acclimatisation of regenerants in conditions *ex vitro*.

**Введение.** В настоящее время во всем мире назрела энергетическая проблема, одним из путей ее решения является поиск альтернативных источников энергии. Такими источниками являются энергия ветра, солнца, рек и морей, а также энергия биотоплива, которая включает в себя энергию от сжигания биогаза и сжигания древесины. Один из путей получения древесины – это использование топливно-энергетических плантаций. Поскольку необходимо массово получать посадочный материал, то удобным вариантом является метод микроклонального размножения. Он интенсивно используется для быстрого размножения многих видов растений. Использование технологии микроклонального размножения позволяет быстро получить необходимое количество растений нового сорта или сохранить коллекцию. В настоящее время не существует полноценной технологии микроклонального размножения, отвечающей в должной степени требованиям, предъявляемым селекционерами и питомниководами к быстроте размножения и качеству получаемого посадочного материала. Практически на всех этапах размножения возникают сложности, связанные в первую очередь с биологическими особенностями вида. Широкое распространение этого метода ограничено в первую очередь тем, что высок риск бактериальной или грибной контаминации. Более того, проростки снабжаются большими дозами регуляторов роста. Эти условия приводят к формированию проростков с аномальной морфологией, анатомией и физиологией. После переноса растений в условия *ex vitro* они могут быстро увядать, т. к. потери воды листьями не ограничены. Кроме того, водное снабжение может быть ограничено из-за низкой проводимости корней и соединений корень – стебель.

Таким образом, после переноса растений в условия *ex vitro* необходим период адаптации с постепенным понижением влажности воздуха. Адаптация осуществляется в условиях регуляции температуры, влажности, освещения, концентрации $CO_2$. У многих растений листья и корни, сформированные в пробирке, неспособны к функционированию в условиях *ex vitro* и заменяются вновь сформированными листьями и корневой системой.

Для промышленного размножения лесных древесных растений методом клонального микроразмножения очень важно использовать в качестве исходного материала ценные формы, сорта, гибриды. Для этого нужно знать биологические особенности вида, его селекционное значение.

Технология микроклонального размножения должна обеспечить решение следующих задач: ускорение селекционного процесса (сокращение времени, затрачиваемого на создание новых гибридов и сортов лесных древесных растений по крайней мере в 2–3 раза), сокращение времени, затрачиваемого на массовое производство посадочного материала новых ценных генотипов с 20–30 лет (в зависимости от породы) до 2–3 лет, обеспечение надежное хранение ценных генотипов неограниченное время в условиях *in vitro* методом депонирования.

Осина, или тополь дрожащий, *Populus tremula* (L.) – дерево из семейства ивовых высотой до 30 м и толщиной до 50–100 см. Крона яйцевидная или широкоцилиндрическая, кора зеленовато-оливковая, гладкая. Растет очень быстро и к 50 годам дает до 400 м$^3$ древесины с 1 га. Доживает до 150 лет. Древесина осины не имеет ядра и состоит только из заболони. Из нее изготавливают спички, этиловый спирт и др. Осиновые дрова низкокалорийны, но они дают длинное и малокоптящее пламя, которое подходит для изготовления гончарных изделий и кирпича. Из древесины осины делали так называемый лемех – дощечки особой формы, которые применяли в русском деревянном зодчестве для покрытия куполов церквей. Игра светотени на старых лемехах придает созданным из них покрытиям серебристый отблеск. Древесина используется на постройки и разнообразные поделки, для получения целлюлозы, древесной массы и древесной стружки. Листья идут на корм скоту. Осину иногда используют в озеленении, потому что она отличается быстрым ростом и устойчивостью к сердцевинной гнили [1–3].

Исследования показали, что немаловажными факторами при посадке регенерантов в условия *ex vitro* являются высота регенерантов, спо-

соб перенесения растений из пробирок, сроки высадки, длина корня, качество субстратов и др. Белорусскими исследователями поднимался вопрос адаптации плодовых деревьев на различных субстратах [4–6], исследованы возможности ризогенеза в условиях *ex vitro* [7]. Зарубежными исследователями изучены возможности снижения транспирации путем обрызгивания антитранспиративными препаратами либо добавлением абсцизиновой кислоты после посадки для снижения устьичной проводимости [8, 9].

Целью наших исследований стало выяснение оптимальной высоты регенерантов осины при выращивании микроклональных растений в условиях *ex vitro*.

**Материалы и методы.** Исследования проводились в лаборатории генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси. Объект исследования – микроклональные растения осины *Populus tremula*, отобранные при посадке по 3 ростовым категориям: 10–30 мм, 31–50 мм и 51–99 мм. Материнское дерево относится к зеленокорой форме осины, отличается быстрым ростом и устойчивостью против сердцевинной гнили. Произрастает в Минской области (Беларусь).

В условиях *in vitro* размноженные растения укоренялись на стандартной среде WPM, освещение 2,5–3,0 тыс. лк, температура – 25°С.

Для адаптации в нестерильных условиях использовался следующий субстрат: смесь торфа с песком в соотношении 3:1, неавтоклавированный, обработанный перед посадкой раствором фунгицида марки «Фундазол»© концентрацией 1 г/л. Состав водной вытяжки приготовленного субстрата представлен в табл. 1.

Адаптация проходила в 2 этапа:

– 1 этап – растения после ризогенеза *in vitro* высаживали в кассеты объемом 100 мл, заполненные субстратом. Кассеты устанавливали в установку с климат-контролем (поддерживаемая влажность 80–90%). При посадке корни регенерантов обрезались до одинаковой длины 1 см. Длительность этапа – 4 недели. Условия первого периода адаптации: освещенность 4–5 тыс. лк, температура 21–23°С, фотопериод 16/8 ч.

– 2 этап – растения переставляли из установки с климат-контролем в отапливаемое помещение. Условия второго периода адаптации: освещенность 5–6 тыс. лк, температура 21–23°С, фотопериод 16/8 ч, влажность 50–60%. Длительность этапа – 4–8 недель.

Морфологическое развитие растений учитывали по показателям длины побега в миллиметрах от поверхности субстрата до последней развитой почки. Также учитывался процент выживших регенерантов и прирост спустя 2 недели, 1 месяц и 2 месяца.

Статистическую обработку данных проводили, используя программу Microsoft Excel.

**Результаты и их обсуждение.** Микроклональные растения при пересадке из стерильных условий в нестерильные получают колоссальный стресс, для преодоления которого требуется проводить различные мероприятия. К ним относится обработка субстрата фунгицидами, освещение светом определенного спектра, использование туманообразующих установок и др. По нашим наблюдениям своевременное выполнение этих мероприятий помогает растениям преодолеть стресс, они не увядают в первые недели адаптации и в дальнейшем наблюдается значительный прирост выживших растений. Проведенное исследование показало, что регенеранты высотой 10–30 мм при посадке к концу 2-го месяца адаптации показали достаточно высокий процент выживания (рис. 1). На рис. 1 также видно, что самый малый процент выживания показали регенеранты, высота которых при посадке в нестерильные условия составляла 51–99 мм. Поскольку самый высокий отпад происходит в первые 2–3 недели адаптации из-за недостаточно развитой проводящей системы и транспирационного аппарата, то уже к концу 1-го месяца адаптации можно наблюдать стабильное количество выживающих регенерантов. За 4–8 недель адаптации происходит минимальный отпад растений.

По показателю средней длины побега в табл. 2 регенерантов также наилучшие результаты наблюдаются у растений с высотой при посадке в условия *ex vitro* 10–30 мм.

Следует отметить, что из-за недостаточного количества выживших регенерантов рассчитать статистически достоверную среднюю длину побега регенерантов высотой 51–99 мм за 4–8 недели адаптации не удалось. Из табл. 2 следует, что в первые 2 недели адаптации происходит существенное снижение средней длины побега регенерантов во всех высотных категориях растений. Именно в это время происходит самая большая нагрузка на растения, и как только этот этап пройден, у растений начинается активный прирост, что видно на рис. 2. Причем прирост выживших растений за 2-й месяц адаптации практически одинаковый у регенерантов высотой 10–30 мм и 31–50 мм.

Таблица 1

**Состав водной вытяжки субстрата для адаптации**

| Субстрат | pH KCl | $N_{общ}$, % | $P_{общ}$, % | $K_{общ}$, % | $P_2O_5$, мг/100 г | $K_2O$, мг/100 г | $N_{легк}$, мг/100 г | Ca + Mg, мг-экв/100 г | Ca, мг-экв/100 г | Mg, мг-экв/100 г |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Торфяная смесь | 3,0 | 0,599 | 0,034 | 0,046 | 2,07 | 13,22 | 27,02 | 5,6 | 4,8 | 0,8 |

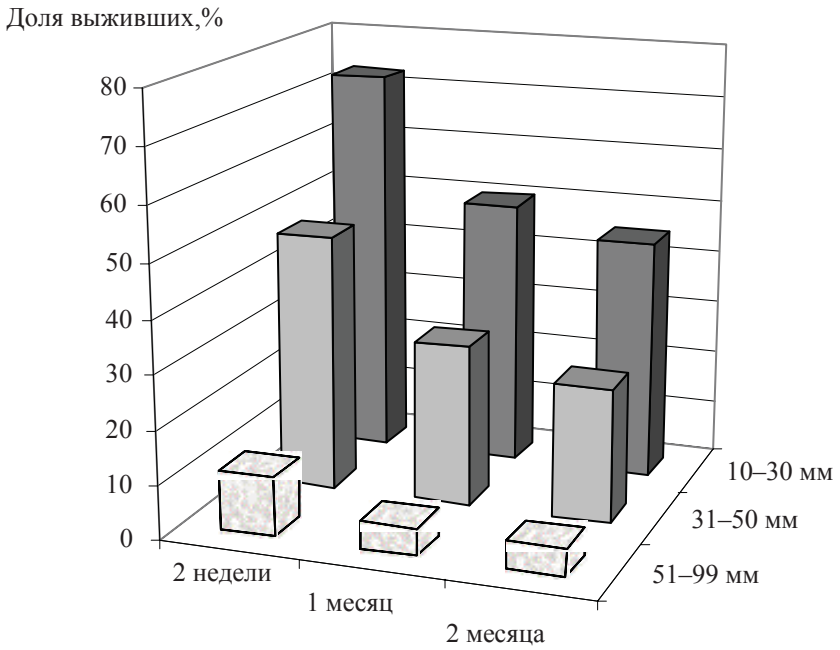


Рис. 1. Доля выживших регенерантов после 2 месяцев адаптации

Таблица 2

**Средняя длина побега регенерантов за период адаптации 8 недель**

| Регенеранты при посадке, мм | Средняя длина побега, мм | | | |
|---|---|---|---|---|
| | при посадке | через 2 недели | через 1 месяц | через 2 месяца |
| 10–30 | 21,20 ± 0,76 | 22,30 ± 1,62 | 37,30 ± 2,18 | 52,80 ± 3,65 |
| 31–50 | 37,40 ± 0,83 | 31,70 ± 3,27 | 47,80 ± 4,17 | 64,00 ± 7,04 |
| 51–99 | 66,90 ± 3,07 | 45,5 ± 15,5 | – | – |

Прирост растений высотой 10–30 мм за 2 месяца адаптации составил 127%, а растений 31–50 мм – 71%. Эти данные можно объяснить тем, что в первые недели адаптации растения переживают различного рода стрессы, после чего начинают быстро набирать рост. Чем раньше на этапе роста происходит стресс, тем лучше и быстрее регенеранты начинают адаптироваться к данным условиям.

**Заключение.** В результате проведенных исследований было изучено влияние высоты регенерантов осины при посадке в нестерильные условия *ex vitro*. Показано, что регенеранты высотой 10–30 мм наилучшим образом проходят этап адаптации по приживанию и по скорости прироста, а наихудшие результаты получены по регенерантам высотой 51–99 мм.

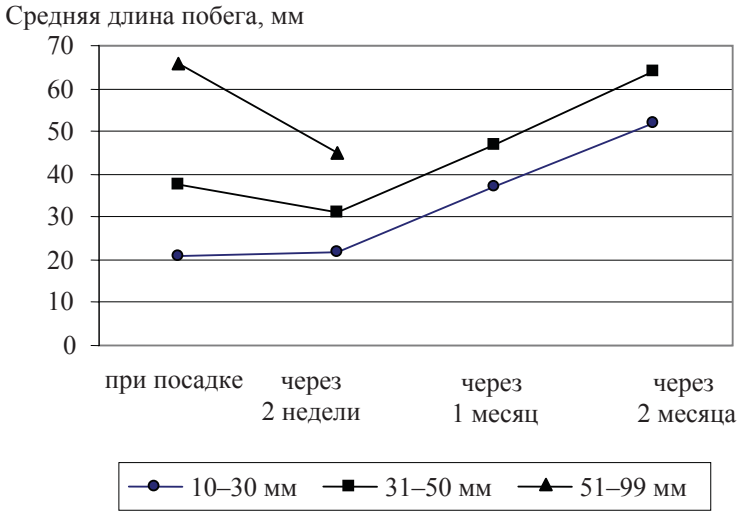


Рис. 2. Средняя длина побегов регенерантов за 2 месяца адаптации

Таким образом, для массового получения посадочного материала осины при использовании метода клонального микроразмножения при посадке в нестерильные условия желательно отбирать регенеранты высотой до 3 см. Также из-за максимального отпада в первые 2 недели адаптации следует проводить ряд мероприятий по сохранению посадочного материала (регулируемая высокая влажность, освещенность и обработка растворами минеральных элементов).

**Литература**


1. Гроздова, Н. Б. Деревья, кустарники и лианы: справ. пособие / Н. Б. Гнездова, В. И. Некрасов, Д. А. Глоба-Михайленко. – М.: Лесн. пром-сть, 1986. – 225 с.

2. Древесные породы мира: в 3 т. – М.: Лесн. пром-сть, 1982. – Т. 3. – 354 с.

3. Определитель деревьев и кустарников средней полосы России в осенне-зимний период / А. С. Боголюбов [и др.]. – М.: Экосистема, 2002. – 243 с.

4. Красинская, Т. А. Влияние ионообменного субстрата БИОНА-112 на биохимические показатели физиологического развития растений подвоев рода *Cerasus* Mill. при адаптации *ex vitro* / Т. А. Красинская, С. Л. Липская // Плодоводство: сб. науч. ст. / Ин-т плодоводства. – Самохваловичи, 2006. – Т. 18; Ч. 1. – С. 37–43.

5. Адаптация регенерантов *ex vitro*/ Н. В. Кухарчик [и др.] // Плодоводство: сб. науч. ст. / Ин-т плодоводства. – Самохваловичи, 2006. – Т. 18; Ч. 2. – С. 174–181.

6. Волосевич, Н. Н. Влияние адаптационных субстратов на морфологическое развитие регенерантов малины сорта Метеор при адаптации *ex vitro* / Н. Н. Волосевич // Плодоводство: сб. науч. ст. / Ин-т плодоводства. – Самохваловичи, 2008. – Т. 20. – С. 37–44.

7. Красинская, Т. А. Укоренение *in vitro* и *ex vitro* подвоя вишни и черешни / Т. А. Красинская // Наука и инновации. – 2008. – № 6 (64).

8. McClelland, M. T. The effect of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in the woody plants / M. T. McClelland, M. A. L. Smith, Z. B. Carothers // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 1990. – Vol. 23. – P. 115–123.

9. Santakumari, M. A new potent antitranspirant on maize plants / M. Santakumari, C. S Raddy, V. S Rama Das. – Proc. Indian Acad. Sci, 1977. – P. 143–150.