

*Л. В. Ташматова*

## УКОРЕНЕНИЕ И АДАПТАЦИЯ ГРУШИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

УДК 634.13:631.524.85:58.083

### Аннотация

В статье представлены результаты исследований укоренения и адаптации растений груши в процессе клонального микроразмножения. Изучено влияние сортовых особенностей, питательной среды, типа, концентрации и способов аппликации ауксинов на корнеобразование груши *in vitro*. Среда МС с разбавленной в два раза минеральной основой и с добавлением ИМК (1мг/л) и НУК (1мг/л) оказалась наиболее эффективной. Установлено положительное влияние препаратов элиситорного действия на адаптацию груши *in vitro* к нестерильным условиям. Показана возможность применения микропрививки для повышения выхода адаптированного посадочного материала трудноукореняющихся и неукореняющихся форм груши в процессе клонального микроразмножения. Обработка срезов подвоя раствором аскорбиновой кислоты повышает приживаемость прививки.

**Ключевые слова:** питательная среда; ауксин; ризогенез; адаптация, элиситоры; микропрививка; подвой; привой.

*L. V. Tashmatova*

## PEAR ROOTING AND ADAPTATION IN CULTURE IN VITRO

### Abstract

The results of the investigations of pear rooting and adaptation at clonal micro propagation are presented. The effect of the varietal features, nutrient medium, type, concentration and methods of the auxin application on pear rooting *in vitro* has been studied. MS medium with mineral base half diluted and with addition of indole-butyric acid (1mg/l) and naphthaleneacetic acid (1mg/l) occur to be mostly effective. A positive effect of elicitors on the adaptation of pear *in vitro* to non-sterile conditions has been determined. The possibility of the micro grafting application for increasing the output of the adaptive planting material of hardly rooting and non-rooting pear seedlings at clonal micro propagation is shown. The treatment of rootstock cut sections with ascorbic acid solution raises the graft striking.

**Key words:** nutrient medium, auxin, rhizogenesis, adaptation, elicitors, micro propagation, rootstock, scion.

## Введение

При выращивании оздоровленного посадочного материала груши для закладки маточных насаждений все чаще используется метод клонального микроразмножения, преимущества которого давно показаны на примере однолетних [6] и многолетних сельскохозяйственных культур [3, 4, 5].

Процесс клонального микроразмножения включает четыре основных этапа: 1) введение в стерильную культуру; 2) собственно микроразмножение; 3) укоренение; 4) адаптация к нестерильным условиям. Последние два этапа являются довольно сложными у многолетних культур, особенно у плодовых. На низкую укореняемость микропобегов *in vitro* оказывают влияние состав питательных сред, тип и концентрация ауксинов и сортовые особенности культуры. Трудности адаптации связаны с нарушением физиологических процессов в связи с переносом растений в новые условия (влажность, температура, пересадка в почвенный субстрат). Поэтому задачей настоящих исследований было подобрать оптимальные питательные среды, индукторы корнеобразования и их концентрации, способы аппликации, изучить способы адаптации микрорастений к нестерильным условиям с применением элиситоров, которые обладают иммуномодулирующими свойствами и вызывают системную устойчивость растений к стрессам, болезням и вредителям. Такое действие этих препаратов основано на индукции защитных сил растений [2].

Малоизученным этапом в технологическом процессе клонального микроразмножения плодовых культур является метод микропрививки, который используют для получения и размножения оздоровленного посадочного материала плохо укореняющихся и адаптирующихся в культуре *in vitro* [1].

## Материал и методика исследований

В исследования включены формы груши: сорта Тютчевская, Лада, Аннушка, Орловская летняя, подвой груша 4, гибрид 40-4, груша березолистная.

На этапе укоренения были испытаны питательные среды с добавлением ИМК в концентрации 1,0 мг/л: Мурасиге-Скуга с разбавленной в два раза минеральной основой, Ли и де Фоссарда, Гамборга, Уайта. Были испытаны концентрации ауксинов ИМК, НУК и ИУК, их сочетания и способы аппликации: введение в питательную среду, замачивание в стерильном спиртовом растворе (ИМК 50 мг/л) в течение 10 секунд и в водном растворе ИМК (25 мг/л) в течение 18 часов, опудривание ИМК-содержащей пудрой. Для изготовления пудры использовали 100г талька, 250 мг ИМК и 20мл спирта. ИМК растворяли в

спирте и этим раствором смачивали тальк. Высушенный тальк растирали пестиком до получения пудры и в стеклянной баночке стерилизовали в автоклаве при давлении 0,8 атмосфер в течение часа. Микропобеги смачивали в стерильной воде, опускали в пудру и сажали на среду Мурасиге-Скуга без ауксинов.

На этапе адаптации было испытано действие иммуномодулирующих веществ элиситорного действия – Экост 1/3 и Эль-1 (аналог эмистима) на приживаемость микрорастений в условиях *in vivo*. Для высадки в почвосмесь брали растения с хорошо сформировавшимся стеблем и корнями. Предварительно готовили субстрат из песка и торфа в соотношении 1:1. Смесь прогревали в сушильном шкафу в течение 2...4 часов при температуре 85...90°C. Перед обработкой корневой системы, готовили рабочий раствор – одну ампулу препарата Эль – 1 растворяли в пяти литрах воды. Этим раствором смачивали одно ведро субстрата. Полученной смесью наполняли горшочки 5x5 см. Обработку Экостом 1/3 проводили путем опудривания корней. Элиситоры использовали как совместно, так и отдельно.

Высаженные растения закрывали стеклянными банками емкостью 200 мл и сверху накрывали белым укрывным материалом. Через две недели банки снимали. Растения подкармливали через каждые 10 дней разбавленным в 4 раза раствором солей Мурасиге-Скуга.

Для микропрививки в качестве подвоя были взяты сеянцы груши, выращенные в закрытом помещении в нестерильных условиях. Толщина стволика не менее 3мм в диаметре. Стволик подвоя не должен быть одревесневшим, то есть побег должен еще расти. Привой брали из культуры *in vitro*. Его размер – 1...1,5 см. Способ прививки в расщеп. Для лучшего срастания и снятия окисления тканей срез подвоя обрабатывали растворами антиоксидантов – аскорбиновой кислотой (50 мг/л), ДИЕКА (2 г/л) и ИМК (25 мг/л). Клинообразный срез привоя совмещали с продольным срезом, а место прививки закрепляли хорошо растягивающейся пленкой. Для предотвращения влагопотери, привитый побег закрывали полиэтиленовым пакетом размером 5x10 см и снизу его скрепляли скотчем.

### Результаты исследований

В результате эксперимента было установлено, что испытанные сорта и формы груши отличаются по ризогенной способности. Так у сорта Тютчевская наблюдали образование корней на всех использованных средах, кроме среды Гамборга. У единичных растений отмечали рост корней первого порядка. В то время как у груши березолистной, подвоя груша 4, гибрида 40-4 и сорта Орловская летняя укоренения не было.

Сравнение питательных сред Мурасиге-Скуга с разбавленной в два раза минеральной основой, Ли и де Фоссарда, Гамборга и Уайта на фоне 1,0 мг/л ИМК показало, что первая среда является оптимальной для укоренения большинства испытанных сортов груши. У сорта Тютчевская наибольшее количество укорененных растений было получено на среде Ли и де Фоссарда (16,7%), однако, несмотря на меньший процент укоренения (12,5) лучшее качество корневой системы (количество корней на одно растение, длина корней) было отмечено на среде Мурасиге-Скуга с разбавленным минеральным составом в два раза.

У сорта Лада корни образовались лишь на питательной среде  $\frac{1}{2}$  Мурасиге-Скуга. Средний процент укоренения составил 21,4. У сорта Аннушка на этой же среде укоренилось 20% микропобегов.

Укоренение побегов груши *in vitro* проводили в течение 1...3 недель. Если, по истечении этого срока ризогенеза не произошло, начиналось подсыхание среда и некроз тканей.

Для укоренения плодовых и ягодных культур чаще используют ИМК в концентрации 0,5...1,0 мг/л. Но в ходе эксперимента выяснили, что у сорта Тютчевская наибольшей эффективности в отношении ризогенеза способствовало введение в среду НУК в концентрации 1,0 мг/л. Среднее значение укореняемости составило 66,7%. В процессе культивирования наблюдали образование небольшого количества каллуса белого цвета. Образование большего количества корней на одно растение вызывало введение в состав питательной среды ИМК (1,0 мг/л) и НУК (0,5 мг/л). Самые длинные корни образовывались в присутствии НУК (0,5 и 1,0 мг/л), сочетаний ИМК+ИУК (по 0,5 мг/л) и НУК+ИУК (по 0,5 мг/л) (таблица 1). При последнем сочетании ауксинов образовывались корни первого порядка.

При сочетании ИМК и НУК в концентрации 1,0 мг/л разрастался каллус серого цвета с вкраплениями красного цвета.

Использование различных способов аппликации ауксинов для микропобегов сорта Тютчевская оказалось менее эффективно, чем непосредственное введение их в состав питательной среды. При испытании способов аппликации наибольшее количество укоренившихся растений получили при обработке микропобегов ИМК-содержащей пудрой. При этом образовывались относительно длинные корни. В среднем их длина составила 10,0 мм (таблица 1).

У сорта Лада при всех испытанных способах стимулирования корнеобразования наибольшее количество укоренившихся побегов (48,6%) получили при введении в питательную среду сочетания ИМК и ИУК в концентрации 0,5 мг/л. А введение тех же препаратов с ауксиновой активностью, но в концентрации 1,0 мг/л образования корней не вызывало. При замачивании микропобегов груши в растворах ИМК и

после обработки ИМК-содержащей пудрой процент укоренения был ниже и колебался от 1,5 до 29,4% (таблица 2).

Таблица 1 – Укоренение побегов груши сорта Тютчевская при различных способах применения индукторов ризогенеза

Варианты	Введение ауксинов в питательную среду			
	Количество экплантов, шт.	% укоренения	Среднее число корней, шт.	Средняя длина корня, мм
1 мг/л ИМК	16	12,5	2,7±1,3	5,6±3,4
0,5 мг/л НУК	35	27,5	2,9±1,9	16,2±10,0
1,0 мг/л НУК	15	66,7	1,7± 0,4	13,7 ±7,8
0,5 мг/л ИУК	20	0	0	0
1,0 мг/л ИУК	20	0	0	0
0,5мг/л ИМК+ 0,5мг/л ИУК	34	8,8	1,3±0,2	21,2±6,4
1мг/л ИМК+ 1мг/л ИУК	31	29,4	1,7±0,3	10,8±5,4
0,5 мг/л НУК+ 0,5 мг/л ИУК	33	48,5	1,7±0,2	15,6±7,2
1мг/л ИМК+ 1мг/л НУК	27	18,5	2,0±0,5	7,8±3,3
Без ауксинов	36	0	0	0
Способы аппликации				
Замачивание в водном растворе (25мг/л ИМК 18 час)	29	5	0,6±0,2	1,8±1,7
Замачивание в спиртовом растворе ИМК (50 мг/л 10сек)	25	0	0	0
Пудра с ИМК	28	19,2	1,2±0,4	10±2,3

Таблица 2 – Укоренение побегов груши сорта Лада при различных способах воздействия

Варианты	Введение ауксинов в питательную среду			
	Количество экплантов, шт.	% укоренения	Среднее число корней, шт.	Средняя длина корня, мм
1 мг/л ИМК	28	21,4	0,9±0,5	2,2±1,7
0,5 мг/л ИМК+ 0,5 мг/л ИУК	35	48,6	1,7±0,3	1,0±0,2
1 мг/л ИМК+ 1 мг/л ИУК	24	0	0	0
0,5 мг/л ИУК	16	0	0	0
Способы аппликации				
Замачивание в водном растворе (25 мг/л ИМК 18 час)	24	25	1,8±0,4	11,6±4,6
Замачивание в спиртовом растворе ИМК (50 мг/л 10 с)	27	1,5	3,3±2,0	8,7±2,7
Пудра с ИМК	27	29,4	3,0±0,9	10,3±2,1

Для подвоя груша 4 испытывали восемь вариантов стимуляторов корнеобразования и четыре способа аппликации. При введении в питательную среду 1,0 мг/л НУК получили наибольший процент

укоренения, который составил 41,2. Введение в питательную среду сочетания ИМК и ИУК в концентрации по 1,0 мг/л обеспечило 27,3% укоренения. Включение в питательную среду сочетания ИУК и НУК в концентрации по 1,0 мг/л вызывало развитие слабых корней. В среднем укореняемость составила 12,9%. Во всех остальных случаях укоренения микропобегов не произошло.

Для укоренения микропобегов груши березолистная включали в состав питательной среды Мурасиге-Скуга ауксины ИМК (1,0 мг/л), ИУК (0,5 мг/л) и сочетание НУК+ИМК в концентрации 0,5 мг/л. Укоренения отмечено не было.

У сорта Орловская летняя укоренению способствовало замачивание микропобегов в водном (ИМК 25,0 мг/л, 18 часов) и спиртовом (ИМК 50,0 мг/л, 10 секунд) растворах. Оно составило 26,9% и 52,9% соответственно.

Для успешной адаптации микрорастений груши в нестерильных условиях было изучено действие иммуномодулирующих препаратов элиситорного действия – Эль-1 (д. е. арахидоновая кислота) и сочетание Экост 1/3 и Эль-1. В качестве контроля использовали адаптацию микрорастений без элиситоров. Объектами исследования служили растения груши сортов Тютчевская, Лада, Орловская летняя и подвой груши 4 (таблица 3).

Таблица 3 – Приживаемость микрорастений груши на этапе адаптации при обработке элиситорами, (%)

Сорт, Форма	Элиситоры		Без элиситоров (контроль)
	Эль-1	Эль-1+Экост 1/3	
Тютчевская	43,7	37,5	26,6
Лада	25,0	*	20,0
Орловская летняя	15,3	*	10,0
Груша 4	53,8	69,2	0
$F_{\phi} > F_{01}$			

\* – нет данных

Эксперимент показал, что у сорта Тютчевская наибольшая приживаемость растений в условиях *in vivo* была при обработке субстрата препаратом Эль-1 и составила 43,7%. Наименьший результат приживаемости получили в контрольном варианте (26,6%).

У подвоя груша 4 при совместном воздействии элиситоров максимальная приживаемость микрорастений 69,2%. В то время как в контрольном варианте не прижилось ни одного растения.

У сортов Лада и Орловская летняя положительное влияние на адаптацию оказал препарат Эль-1 (таблица 3).

В результате эксперимента были получены корнесобственные растения груши.

Еще одним способом получения адаптированных растений *in vitro* является микропрививка.

В предыдущих экспериментах на этапах укоренения и адаптации у сорта Тютчевская был получен сравнительно небольшой выход полноценных, адаптированных к нестерильным условиям растений. При использовании микропрививки с обработкой среза подвоя раствором аскорбиновой кислоты выжило 91,7% растений. При использовании растворов ИМК и ДИЕКА приживаемость была несколько хуже (таблица 4).

Таблица 4 – Выход растений при различных способах выращивания (%).

Сорт, форма	Прививка			Адаптация укорененных <i>in vitro</i> микропобегов
	Обработка срезов аскорбиновой кислотой, 50мг/л	Обработка срезов ИМК, 5мг/л	Обработка срезов ДИЕКА, 2г/л	
Тютчевская	91,7	83,3	80,0	43,7
Лада	55,0	10,0	*	25,0
40-4	65,0	20,0	*	0
		$F_{\text{сорта}} > F_{01}$	$F_{\text{прививки}} > F_{05}$	

\* – нет данных

У сорта Лада в контрольном варианте приживаемость растений составила 25,0%. В результате микропрививки с использованием раствора аскорбиновой кислоты выход жизнеспособных растений был выше в два с лишним раза по сравнению с этапом адаптации – 55,0%.

У микропобегов гибрида 40-4 на этапе укоренения образования корней не произошло. При использовании микропрививки наибольший выход укорененных растений (65,0%) получили при обработке срезов подвоя раствором аскорбиновой кислоты.

Признаком срастания привоя и подвоя было начало роста привоя. Через две недели, когда привой начинал расти, верхнюю часть покровного пакета среза и в течение следующей недели привой выдвигался наружу, постепенно адаптируясь к нестерильным условиям. В течение месяца формировались побеги длиной 2...4 см. Когда исчезала угроза заморозков, полученные растения высаживали в весенние теплицы.

## Выводы

Таким образом, использование среды Мурасиге-Скуга с разбавленным в два раза минеральным составом и с добавлением

ауксинов ИМК 1,0 мг/л, НУК 1,0 мг/л, а также сочетания ИМК+НУК по 0,5 мг/л, НУК+ИУК по 0,5 мг/л и ИМК+ИУК по 1,0 мг/л в большей степени стимулирует образование корней. Необходимо учитывать так же сортовые особенности культивируемых сортов. Использование препаратов элиситорного действия и микропрививки позволяет легче перенести растениям *in vitro* стресс при пересадке в нестерильные условия и тем самым повысить выход укорененных, хорошо адаптированных растений груши.

### Литература

1. Долгих, С. Д. Особенности микропрививки яблони *in vitro* / С. Д. Долгих // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур : материалы междунар. науч.-практ. конф. (20-22 ноября 2001) – М., 2001. – С. 139-141.
2. Карпова, О. В. Адаптация пробирочных растений ягодных культур и последствия криосохранения: дис. канд. с/х : 06.01.07. : защищена 17.05.01 / Карпова Ольга Викторовна. – М., 2001. – С. 145.
3. Свириденко, Э. И. Особенности размножения облепихи *in vitro* / Э. И. Свириденко, В. М. Бурдалов, О. П. Дудченко // Биол. культивир. клеток и биотехнол. раст. / Ан.ССР. Ин-т физиол. раст. – М., 1991. – С. 221-224.
4. Стаканова, Р. В. Ускоренное размножение яблони в асептических условиях / Р. В. Стаканова, Н. М. Абраменко // Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии. – 1984. – №6. – С. 29-31.
5. Benjongliba, A. N. Micropropagation in some plum cultivars / A. N. Benjongliba, D. S. Som // Fruit. sci. Repts. – 1990. – 17. – №2. – P. 57-68.
6. Shin-ichi, W. Conditions of rooting from shoot for mass propagation in asparagus / W. Shin-ichi, J. Shigrueru, Y. Toshiro // J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. – 1991. – 64. – №4. – P. 292-303.