

УДК 634.11:631.541.11:581.143.5

РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ 54-118 И 62-396 IN VITRO И IN VIVO

О.В. Матушкина, И.Н. Пронина, Е.А. Каплин

ГНУ Всероссийский НИИ садоводства им. И.В. Мичурина Россельхозакадемии,
ул. Мичурина, 30, г. Мичуринск, Тамбовская область, 393774, Россия,
e-mail: invitro82@yandex.ru

РЕФЕРАТ

При клональном микроразмножении клоновых подвоев яблони 54-118 и 62-396 отмечается высокая регенерационная способность как на этапе введения в культуру, так и собственно микроразмножения. Усилению темпов дифференциации тканей *in vitro* способствует использование в качестве эксплантов верхушечных почек, введение в состав питательной среды антиоксидантов (аскорбиновой кислоты), БАП в концентрации 0,3-2,0 мг/л. Установлено, что подвой яблони 54-118 относится к трудноукореняемым формам, для укоренения которого следует использовать ИМК в концентрации 1,0-2,0 мг/л, а для подвоя 62-396 – ИУК 3,0-5,0 мг/л, как легкоукореняемого. В маточниках, заложенных растениями, полученными методом *in vitro*, отмечено повышение продуктивности на 20,0-26,0 % и увеличение выхода стандартных отводков с 1 га в 1,3 раза.

Ключевые слова: яблоня, клоновый подвой, клональное микроразмножение, цитокинин, маточник, продуктивность, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Садоводство – одна из наиболее значимых для здоровья человека отраслей сельского хозяйства Российской Федерации. Стратегической целью современного интенсивного садоводства является организация высокотехнологичного процесса производства плодов и ягод программируемого качества на базе использования нового поколения сортов и подвоев, на основе ускоренного развития питомниководства с освоением новейших методов биотехнологии.

В структуре плодовых насаждений ведущее положение занимает яблоня. Это высокопродуктивная культура, при правильном уходе дающая ежегодные урожаи, отличается меньшей требовательностью к условиям произрастания и более высокой адаптивностью. Однако доля насаждений яблони на клоновых подвоях не превышает 10 % и садоводство на данный момент не удовлетворяет потребности населения в плодах и ягодах [1]. При минимально необходимом ежегодном объеме производства плодов в 7,5-8,0 млн т выращивается только 2,4-2,5 млн т (треть необходимого).

Существенную роль в снижении урожайности плодовых и ягодных культур играют вирусные и фитоплазменные заболевания. Так, например, вирус ямчатости древесины яблони (ASPV) снижает урожайность на 10-40 % [2]. Сады, заложенные безвирусными высококачественными саженцами, вступают в плодоношение сразу же после посадки в сад, а на 2-3-й год дают урожай около 30 т/га при размещении на гектаре 3 тыс. деревьев [3]. В связи с этим, возникает необходимость в производстве сертифицированного посадочного материала с использованием метода клонального микроразмножения.

Этот метод размножения можно рассматривать как перспективный и наиболее полно реализующий потенциал растительного организма к воспроизводству, что позволяет повысить продуктивность маточных и плодоносящих насаждений и эффективность отрасли садоводства в целом [4].

Несмотря на большие капитальные и текущие затраты на оборудование биотехнологических лабораторий, необходимость использования высококвалифицированного персонала, низкую регенерационную способность отдельных генотипов и нерешенные проблемы при адаптации пробирочных растений метод культуры тканей остается в отдельных случаях единственным возможным способом получения оздоровленного посадочного материала [5].

Цель исследований. Изучить регенерационную способность клоновых подвоев яблони 54-118 и 62-396 *in vitro* и *in vivo*.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили клоновые подвои яблони селекции В.И. Будаговского – 54-118 и 62-396.

Экспланты культивировали на средах Мурасиге-Скуга (МС) и Кворина-Лепуавра (QL) с дополнением 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрации 0,3-2,0 мг/л. На этапе ризогенеза использовали питательные среды, разбавленные вдвое по минеральному составу с индолилмасляной (ИМК) и индолилуксусной кислотами (ИУК).

Условия культивирования: температура воздуха 24±2 °С, освещенность 2-3 тыс. люксов, 16-часовой фотопериод.

Маточник клоновых подвоев с комбинированным способом размножения заложен весной 2009 г. по схеме посадки 1,6 x 0,2 м, в качестве окучивающего субстрата применяли перепревшие опилки хвойных пород.

Учеты в маточнике проводили согласно «Программе и методике сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» [6], оценку качества отводков – по ГОСТу Р 53135-2008 [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в средней зоне садоводства России наибольшее распространение получили клоновые подвои 54-118 и 62-396, характеризующиеся высокой зимостойкостью, хорошей укореняемостью и высокой совместимостью с большинством сортов. Существует несколько способов размножения клоновых подвоев, ведущее место среди которых в системе производства сертифицированного посадочного материала отводится клональному микроразмножению.

От начального этапа клонального микроразмножения – введения в культуру – зависит весь последующий цикл регенерации растений. Наиболее эффективно мультипликация меристематических тканей подвоев яблони 54-118 и 62-396 происходит на средах Мурасиге-Скуга и Кворина-Лепуавра с добавлением БАП 0,3 мг/л. Более высокой регенерационной способностью обладают верхушечные почки, у которых через 1 месяц культивирования 35,2 % (62-396) и 37,5 % (54-118) эксплантов достигли фазы розетки, что в 5,7 и 1,2 раза больше, чем у пазушных почек (рисунок). Такое неодинаковое развитие объясняется как морфологической неоднородностью почек, так и их различным физиологическим состоянием.

У яблони в связи с возможностью ингибирования ростовых процессов эксплантов токсичными веществами (фенольными соединениями), выделяемыми в среду, целесо-

образно использовать антиоксиданты. Так, например, добавление аскорбиновой кислоты в концентрации 20,0 мг/л на этапе введения в культуру *in vitro* подвоя яблони 54-118 способствовало снижению общего уровня регенерации, но увеличивало скорость дифференциации меристематических тканей почти в 2 раза. У подвоя 62-396 количество регенерировавших эксплантов на среде с аскорбиновой кислотой было на 38,6 % больше, чем без нее. Формирование розеток у данного подвоя в обоих вариантах опыта не наблюдалось.

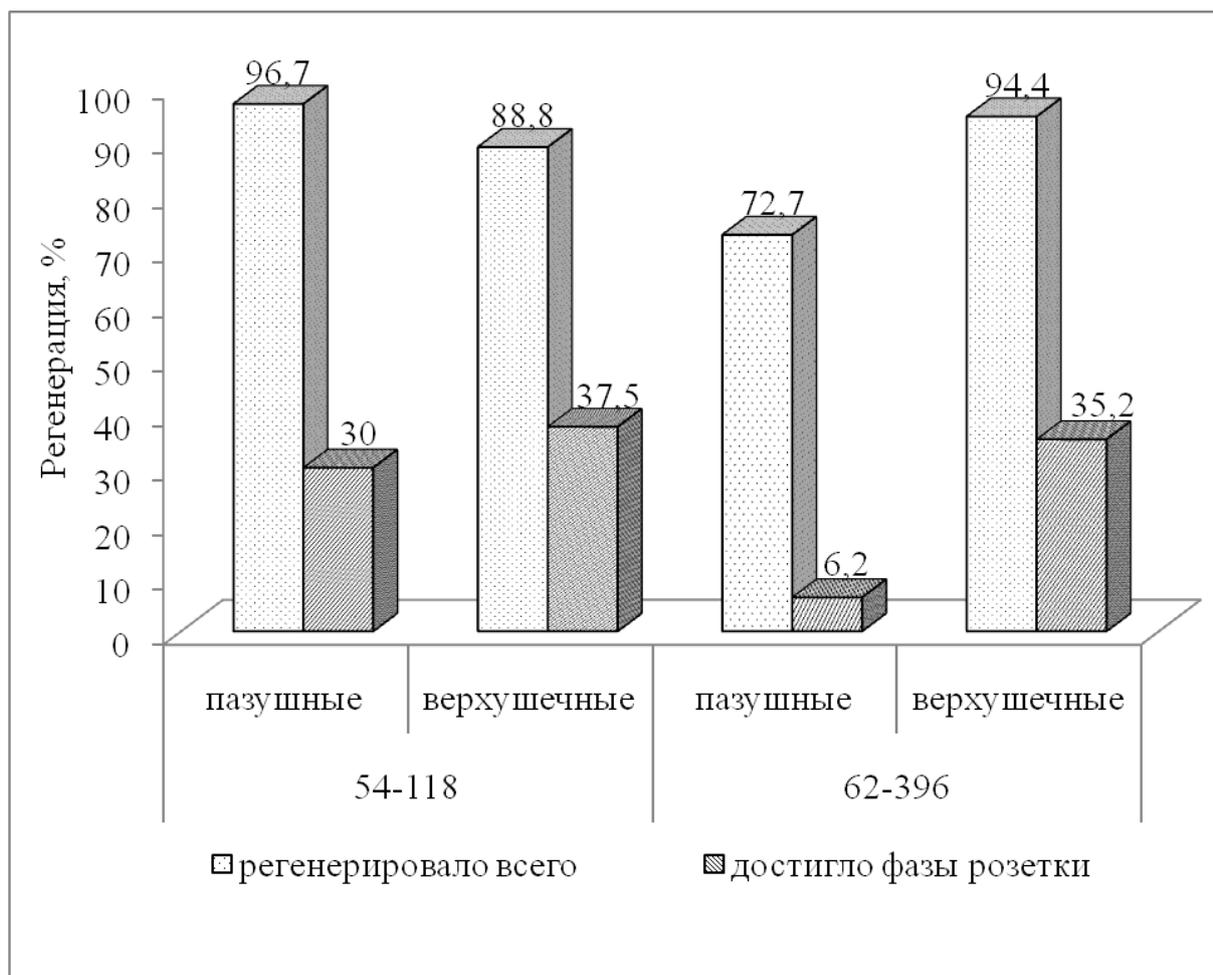


Рисунок – Регенерационная способность меристематических тканей клоновых подвоев яблони (через 1 месяц культивирования).

Темпы дифференциации тканей *in vitro* на этапе пролиферации определяются типом цитокинина и его концентрацией. Для изучаемых клоновых подвоев яблони лучше использовать БАП в концентрации 2,0 мг/л, обеспечивающий варьирование коэффициента размножения от 5,5 до 6,3 шт./экспл. (таблица 1). Использование зеатина и кинетина снижало коэффициент размножения в 1,2-4,2 раза, но увеличивало количество микропобегов, пригодных для укоренения, на 10,4-55,0 %. Специфичное действие оказывал тидиазурон (TDZ), как более сильный цитокинин, который, хотя и увеличивал коэффициент размножения, но способствовал образованию очень мелких микропобегов, не пригодных для укоренения.

Основным индуктором ризогенеза в условиях *in vitro* является ауксин, обычно это индолилмасляная (ИМК) и индолилуксусная (ИУК) кислоты. Способность к ризогенезу

у изучаемых подвоев различна: 54-118 относится к трудноукореняемым генотипам и для его укоренения следует использовать ИМК в концентрации 1,0-2,0 мг/л, а для 62-396 – ИУК в концентрации 3,0-5,0 мг/л, как легкоукореняемого подвоя. Однако постоянное присутствие ауксина в питательной среде оказывает положительное действие только на первой стадии ризогенеза (заложения корневых зачатков), а на рост корней – ингибирующее действие и вызывает каллусообразование. Поэтому целесообразно проводить замачивание микрочеренков в водном растворе ИМК в концентрации 30 мг/л в течение 18-24 часов или в концентрации 50-100 мг/л в течение 20-30 минут. Данный способ обработки микрочеренков способствует более раннему (на 7-10-й день) началу корнеобразования и позволяет довести укореняемость до 95-100 %.

Таблица 1 – Влияние цитокининов на пролиферацию подвоев яблони

Подвой	Цитокинин, мг/л	Коэффициент размножения, шт./экспл.	Количество микропобегов, пошедших на укоренение, %
62-396	БАП 2,0 (контроль)	6,3	25,0 b
	TDZ 0,5	8,1	0,0
	Кинетин 5,0	1,5	80,0a
	Зеатин 5,0	5,3	35,5 b
НСР ₀₅		0,9	
54-118	БАП 2,0 (контроль)	5,5	54,3 b
	TDZ 0,5	7,6	0,0
	Кинетин 5,0	2,8	64,7 ab
	Зеатин 5,0	4,5	78,1 a
НСР ₀₅		1,1	

Растения, полученные *in vitro*, были высажены в интенсивный отводковый маточник клоновых подвоев. Проведенные исследования показали, что меристемные растения в маточнике обладают более высокой энергией роста и повышенной регенерационной способностью (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние способа размножения на продуктивность клоновых подвоев яблони в отводковом маточнике (2009-2012 гг.)

Подвой	Способ размножения	Продуктивность, тыс. шт./га	Стандартных	
			тыс. шт./га	%
54-118	контроль*	248,0	80,6	32,5
	<i>in vitro</i> **	297,6	105,4	35,4
НСР ₀₅		22,5	11,2	-
62-396	контроль	210,8	117,8	55,9
	<i>in vitro</i>	266,6	155,0	58,1
НСР ₀₅		31,4	21,1	-
* – маточные растения, полученные традиционным способом;				
** – маточные растения, размноженные методом <i>in vitro</i> .				

Так, продуктивность растений *in vitro* была на 20,0-26,0 % выше, а выход стандартных отводков с 1 га увеличивался в 1,3 раза. Отводки, полученные от меристемных растений, превосходили по качественным показателям контрольный вариант: высота

растений увеличивалась на 16-17 %, диаметр штамбика (на высоте 30 см от места отделения отводка) – на 14,0-15,0 % и высота зоны окоренения – на 22,0-24,0 % (таблица 3).

Таблица 3 – Качественные показатели отводков подвоев яблони в маточнике (2009-2012 гг.)

Подвой	Способ размножения	Высота отводка, см	Диаметр, отводка, мм	Высота зоны окоренения, см
54-118	контроль*	64	4,5	12,8
	in vitro**	75	5,2	15,6
НСР ₀₅		3,0	0,2	1,1
62-396	контроль	54	5,0	13,5
	in vitro	63	5,7	16,8
НСР ₀₅		$F_{\text{факт}} < F_{\text{теор}}$	0,5	1,5
* – маточные растения, полученные традиционным способом;				
** – маточные растения, размноженные методом in vitro.				

Использование метода клонального микроразмножения позволяет не только выпускать конкурентоспособный посадочный материал высших категорий качества, но и увеличить прибыль от реализации высококачественного посадочного материала, как, например, у подвоя яблони 62-396 в 1,5 раза (таблица 4).

Таблица 4 – Экономическая эффективность производства подвоя яблони 62-396 с использованием метода in vitro (в ценах 2010 г.)

Показатель	без in vitro	с in vitro
Выход стандартных отводков, тыс. шт. с 1 га маточника	117,8	155,0
Всего затрат, тыс. руб./га	260,3	265,0
Себестоимость, руб./шт.	2,21	1,71
Средняя цена реализации*, руб./шт.	8,9	9,2
Выручка, тыс. руб./га	1048,4	1426,0
Прибыль, тыс. руб./га	788,1	1161,0
Уровень рентабельности, %	302,8	438,1
* – средняя цена реализации зависела от качества и количества подвоев 1-го и 2-го товарных сортов.		

Таким образом, качество посадочного материала определяет стабильность, продуктивность маточных и промышленных насаждений, а также и товарность продукции, что, в свою очередь, оказывает существенное влияние на экономические показатели отрасли садоводства.

ВЫВОДЫ

При культивировании in vitro клоновые подвои яблони 54-118 и 62-396 отличаются высокой регенерационной способностью как на этапе введения в культуру, так и собственно микроразмножения. Увеличению уровня пролиферации способствует использование в качестве эксплантов верхушечных почек, введение в состав питательной среды аскорбиновой кислоты в концентрации 20,0 мг/л и БАП в концентрации 0,3-2,0 мг/л. Подвой 54-118 относится к трудноукореняемым формам, для укоренения которого следует использовать ИМК в концентрации 1,0-2,0 мг/л, а для 62-396 – ИУК в concentra-

ции 3,0-5,0 мг/л, как легкоукореняемого. При использовании растений, размноженных методом *in vitro*, отмечено повышение продуктивности маточника клоновых подвоев яблони на 20,0-26,0 %, выхода стандартных отводков с 1 га в 1,3 раза, что позволило увеличить прибыль от реализации высококачественного посадочного материала в 1,5 раза.

Литература

1. Дядченко, Д.Г. Некоторые итоги и задачи экономических исследований в садоводстве / Д.Г. Дядченко // Основные итоги и перспективы научных исследований ВНИИС им. И.В. Мичурина (1931-2001 гг.): сб. науч. тр. / ВНИИС. – Тамбов, 2001. – Т. 1. – С. 19-29.
2. Петрова, Ф.Д. Оздоровление и размножение садовых культур *in vitro* / Ф.Д. Петрова, М.Т. Упадышев // Садоводство и виноградарство. – 2004. – № 4. – С. 12-13.
3. Бондаренко, А.О. Высокоинтенсивные технологии в садоводстве / А.О. Бондаренко, А.О. Цимбровська // Новости садоводства. – 1996. – № 1-4. – С. 18-20.
4. Пронина, И.Н. Экономические аспекты использования клонального микро размножения в системе производства посадочного материала плодовых и ягодных культур / И.Н. Пронина, О.В. Матушкина // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. статей / ВСТИСП; редкол.: И.М. Куликов [и др.]. – М., 2011. – Т. XXV1. – С. 82-88.
5. Куликов, И.М. Биотехнологические приемы в садоводстве: экономические аспекты / И.М. Куликов, В.А. Высоцкий, А.А. Шипунова // Садоводство и виноградарство. – 2005. – № 5. – С. 24-27.
6. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур/ ВНИИСПК; под общ. ред. Е.Н. Седова и Т.П. Огольцовой. – Орел: ВНИИСПК, 1999. – 608 с.
7. Посадочный материал плодовых, ягодных, субтропических, орехоплодных, цитрусовых культур и чая. Технические условия: ГОСТ Р 53135–2008. – Введ. 01.01.2009. – М., 2009. – С. 1-8.

REGENERATIVE CAPACITY OF APPLE CLONAL ROOTSTOCKS 54-118 AND 62-396 IN VITRO AND IN VIVO

O.V. Matushkina, I.N. Pronina, Ye.A. Kaplin

SUMMARY

High level of regenerative ability is observed either at the stage of introduction into culture and proliferation during micropropagation of apple clonal rootstocks 54-118 and 62-396. Use of tip bud explants, supplement of BAP at concentration 0.3-2.0 mg/l and antioxidants promotes more rapid tissue differentiation *in vitro*. It has been established that rootstock 54-118 is a hard-to-root one; therefore IBA should be used for its rooting at concentration of 1.0-2.0 mg/l. For the rootstock 62-396, that is an easy-to-root one, the concentration of IAA of 3.0-5.0 mg/l is recommended. The usage of plants propagated *in vitro* provides 20.0-26.0 % increase of productivity of apple clonal rootstock and 1.3 fold increment of yield of standard layers per ha at a mother plantation.

Key words: apple, clonal rootstock, clonal micropropagation, cytokinin, mother plantation, productivity, Russia.

Дата поступления статьи в редакцию 03.04.2014