

РОЛЬ ВЕГЕТАТИВНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ХВОЙНЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ДЛЯ НУЖД ЛЕСНОГО И САДОВО-ПАРКОВОГО ХОЗЯЙСТВА

В. В. Красноперова, аспирант,
ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА,
ул. Студенческая, д. 11, г. Ижевск, Россия, 426069,
E-mail: vlada-vk@bk.ru;

Д. Н. Власевский,
ФГБНУ Удмуртский НИИСХ,
ул. Ленина, 1, с. Первомайский, Завьяловский район, Удмуртская Республика, Россия, 427007
E-mail: ugniish@yandex.ru

Аннотация. В исследованиях 2016–2017 гг. рассматривается вопрос вегетативного размножения хвойных растений методом культуры *in vitro*. Работы по выделению модельных особей для сбора эксплантов проводились на базе Удмуртского государственного университета в разных экологических категориях насаждений города Ижевска Удмуртской республики. Лабораторные опыты проводили в стерильных условиях меристемной лаборатории Удмуртского НИИСХ. В культуру *in vitro* вводили почки и стеблевые черенки взрослых особей хвойных растений. Для стерилизации тканей хвойных растений использовали 3 реагента: 5% раствор гипохлорита натрия (контроль); 5% спиртовой раствор хлоргексидина; 6% раствор хлорамина. Посадку эксплантов проводили на питательные среды с добавлением антибиотика, сахарозы и активированного угля: среда Мурасиге-Скуга (MS) (контроль); среда Андерсона; среда Woody Plant Medium (WPM). Гормоны роста добавляли по схеме в каждую питательную среду: 1) без гормонов (контроль); 2) 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота); 3) 2,4-динитрофенол; 4) 2,4-Д + 6-БАП (6-бензиламинопурин); 5) 2,4-динитрофенол + 6-БАП. В результате исследований изучены технологии вегетативного размножения хвойных растений современными биотехнологическими методами для нужд лесного и садово-паркового хозяйства. Определен наилучший стерилизующий реагент – гипохлорит натрия, воздействующий на грибную и бактериальную микрофлору и не повреждающий меристематические ткани эксплантов. На питательной среде WPM продолжили свое развитие 64% черенков, что является наилучшим показателем среди используемых сред. Сочетание гормонов ауксина и цитокинина в питательной среде ускорило каллусообразование на 5–10 дней по сравнению с другими вариантами опыта.

Ключевые слова: хвойные растения, культура *in vitro*, стерилизация, питательные среды, регуляторы роста, каллусогенез.

Введение. В настоящее время в жилой зоне городской среды зеленые насаждения являются одним из наиболее эффективных экономических средств повышения комфортности и качества жизни населения [1].

В условиях увеличения техногенных нагрузок санитарно-гигиеническая роль покрытых растительностью пространств города является мощным средством нейтрализации вредных последствий техногенного загрязнения. Озелененные территории влияют на микроклиматические характеристики городской среды, оказывают воздействие на скорость движения

воздушных потоков, уровень инсоляции поверхностей на уровне земли, зданий и сооружений, а также снижают шумовую нагрузку от автомобилей и других источников [2].

Вопрос экологической устойчивости лесных и пригородных экосистем поднимается в работах многих авторов. В своих исследованиях они указывают на необходимость производства высококачественного посадочного материала лесных и декоративных культур для поддержания популяций хозяйственно-ценных пород древесных растений и их быстрое возобновление различными методами [3, 4, 5–9].

В озеленении городов в основном преобладают лиственные породы, хвойные – используются реже, что связано с их низкими адаптивными возможностями. Однако хвойные насаждения способны к значительному вкладу в оздоровление атмосферного воздуха промышленных районов, для них характерна значительная газо- и пылезадерживающая способность. Повышенную устойчивость к атмосферным загрязнителям проявляют голубые и сизые формы ели колючей (*Picea pungens* Glauca) [1].

С внедрением новых приемов и методов выращивания посадочного материала появилась возможность ускорить размножение древесных пород с сохранением хозяйственно ценных признаков для городского озеленения. Эта проблема решается с помощью принципиально новых методов вегетативного размножения, основанных на биотехнологии [10].

Биотехнологические процессы базируются на использовании биотехнологического потенциала микроорганизмов, растительных и животных клеток, тканей и органов, культивируемых на искусственных питательных средах. В настоящее время во многих странах мира развитию биотехнологии придается первостепенное значение в силу ряда существенных преимуществ перед другими видами технологий: биотехнологические процессы обладают низкой энергоемкостью, почти безотходны, экологически чистые [11]. Такой технологии выращивания посадочного материала улучшенного качества уделяют внимание и придают большое значение зарубежные авторы [12–16].

Обычно наиболее пригодны для культивирования *in vitro* экспланты из семян или проростков (ювенильный материал). Однако, посадочный материал, полученный таким способом, аналогичен посадочному материалу из семян, использование которого не позволяет полностью воспроизвести генотип исходного растения.

Поэтому наибольший интерес представляет использование в качестве первичного экспланта вегетативных частей растений. В научной литературе имеется ряд публикаций, свидетельствующих об успешных экспериментах, выполненных на растениях сосны: *Pinus roxburghii*, *P. patula*, *P. wallichiana*, *P. sibirica*; лиственницы: *Larix decidua*, *L. lep-*

tolepis, *L. laricina*, *L. x eurolepis*, ели европейской *Picea abies*, можжевельника сибирского *Juniperus sibirica*, хвойника односемянного *Ephedra monosperma* [15, 17, 18, 19].

Полученный методом клонального микроразмножения посадочный материал генетически абсолютно идентичен исходной форме. Однако материнское растение должно быть здоровым, не поражённым грибными, бактериальными и вирусными болезнями.

Цель исследования – выявить наиболее эффективный способ ускоренного размножения хвойных пород для нужд лесного и садово-паркового хозяйства.

Главной задачей является введение в культуру *in vitro* хвойных растений ели европейской *Picea abies* (L.) Karst. и ели колючей *Picea pungens* Engelm.

Методика. Исследования 2016–2017 гг. проводили в стерильных условиях меристемной лаборатории Удмуртского НИИСХ. В работе использовали метод микрклонального размножения растений *in vitro*, основанный на вычленении меристематических тканей вегетативных частей средневозрастных древесных растений хвойных пород.

Определение древесных растений ели европейской *Picea abies* (L.) Karst. и ели колючей *Picea pungens* Engelm. с хорошим жизненным состоянием для дальнейшего сбора эксплантов проводилось на базе Удмуртского государственного университета. Стационарные участки заложены в разных экологических категориях насаждений, произрастающих в условиях разной степени интенсивности загрязнения среды г. Ижевска, крупного промышленного центра Приволжского региона [20]. Выделены модельные особи, отличающиеся высокими баллами жизнестойкости и высокой функциональной активностью. В дальнейшем с этих растений проводился сбор почек и черенков для введения в культуру *in vitro*.

Для стерилизации тканей хвойных растений использовали 3 реагента: 5% раствор гипохлорита натрия (контроль), экспозиция – 30 мин; 5% спиртовой раствор хлоргексидина, экспозиция – 10 мин; 6% раствор хлорамина, экспозиция – 10 мин. После этого экспланты промывали 3 раза в стерильной дистиллированной воде.

Посадку эксплантов проводили на различные питательные среды с добавлением

одинакового количества антибиотика, сахара и активированного угля: среда Мурасиге-Скуга (MS) (контроль); среда Андерсона; среда Woody Plant Medium (WPM).

Добавление гормонов роста проводилось по схеме в каждую питательную среду: 1) без гормонов (контроль); 2) 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) – 2 мг/л; 3) 2,4-динитрофенол – 0,092 мг/л; 4) 2,4-Д + 6-БАП (6-бензиламинопурин) – 2 мг/л + 2 мг/л; 5) 2,4-динитрофенол + 6-БАП – 0,092 мг/л + 2 мг/л.

Пробирки с эксплантами в течение двух недель культивировали в комнате без доступа света при температуре 22...25 °С и влажности 70%. Дальнейшее культивирование проводили при +26 °С, световом периоде 16 ч и освещённости 4–5 тыс. люкс.

Результаты. В результате исследований 2016–2017 гг. наилучшим стерилизующим агентом отмечен 5% раствор гипохлорита натрия с 30-минутной экспозицией стеблей и почек хвойных растений. Наиболее эффективной оказалась стерилизация почек: приживаемость ели колючей составила 83%, ели европейской – 65%. Для стерилизации стеблевых черенков потребовалось увеличение концентрации раствора гипохлорита натрия до 7–10%.

Использование хлоргексидина с экспозицией 10 минут позволило избавиться от грибкового заражения, но привело к полному отмиранию тканей эксплантов. Стерилизация раствором хлорамина в течение 10 минут показала противоположный результат, обеспечить асептику тканей растений не удалось. В связи с заражением питательной среды грибной и бактериальной микрофлорой все экспланты погибли.

Оптимальной средой для посадки эксплантов определена среда WPM, на которой

продолжили свое развитие 64% черенков от общего количества высаженных эксплантов. На среде Андерсона и Мурасиге-Скуга выживаемость эксплантов составила 21 и 15% соответственно. В сравнении с другими средами экспланты на среде WPM имели ярко-зеленую окраску и свежий вид более длительное время; интенсивный верхушечный рост и рост каллуса продолжался в течение 6 месяцев.

Добавление гормонов роста в питательную среду также повлияло на рост эксплантов и образование каллуса. Наилучший результат получен при совместном добавлении в среду ауксина и цитокинина, при этом к третьей неделе культивирования был заметен верхушечный рост черенков, тогда как на среде без гормонов рост начался на две недели позже. Сочетание гормонов в питательной среде ускорило каллусообразование, которое началось на 10-й день после посадки, при добавлении только ауксинов нарастание каллуса стало заметно на 15–17 день, а на безгормональной среде каллус образовался на 22–25 день или не обнаружен вовсе.

Выводы. 1. По результатам исследований определен оптимальный стерилизующий реагент – раствор гипохлорита натрия (NaOCl), который позволил избавиться от бактериального и грибкового заражения эксплантов при сохранении жизнеспособности меристематических тканей.

2. Наиболее оптимальной питательной средой для введения в культуру *in vitro* хвойных растений определена среда WPM, позволяющая длительное время культивировать растения перед посадкой в почву.

3. Сочетание ауксинов и цитокининов в питательной среде также способствовало лучшему росту и развитию каллуса эксплантов.

Литература

1. Биоэкологические особенности хвойных растений в условиях городской среды: уч.-науч. изд. / И. Л. Бухарина, А. С. Пашкова, К. Е. Ведерников [и др.]. Ижевск : Удмуртский ун-т, 2015. 152 с.
2. Масалова Л. И., Фирсов А. Н. Перспективы использования североамериканских хвойных интродуцентов для улучшения микроклимата населенных пунктов // Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине : материалы Междунар. науч.-практич. конф. Москва : Щербинская типография, 2016. С. 114–118.
3. Корнев И. А. Перспективы развития микрклонального размножения древесных и недревесных растений в Костромской области // Труды Санкт-Петербургского НИИ лесного хозяйства. 2011. Вып. 1 (24). Ч. 2. С. 52–55.
4. Costanza A., McCord S. Forest Biotechnology and Its Responsible Use: A Biotech Tree Primer by the Institute of Forest Biotechnology / Createspace. 2011. 30 p.
5. Газизуллин А. Х. Современное состояние лесной биотехнологии в мире и в России // Вестник Казанского ГАУ, 2012. № 4 (26). С. 94–98.
6. Жигунов А. В. Применение биотехнологий в лесном хозяйстве России // Лесной журнал. 2013. № 2. С. 27–35.

7. Фотосинтетическая активность хвойных растений в условиях урбаноэкосистем (на примере г. Ижевска) / А. С. Алексеенко, Е. В. Пашков, К. Е. Ведерников [и др.] // Известия Уфимского научного центра РАН. 2013. № 3. С. 57–60.
8. Видякин А. И. Научные основы восстановления и сохранения лесных генетических ресурсов России // Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири : материалы 4-го междунар. совещания, 24-29 августа 2015 г. Барнаул, 2015. С. 33–34.
9. Красноперова В. В. Использование хвойных растений в городском озеленении // Городская среда: экологические и социальные аспекты : сб. статей науч.-практич. конф., 19 апреля 2017 г. Ижевск, 2017. С. 135–139.
10. Лесные культуры: учебное пособие / под общ. ред. проф. А. Р. Родина. Н. Новгород, 2009. 464 с.
11. Калашникова Е. А., Родин А. Р. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов клеточной и геномной инженерии: учеб. пособие; изд. 2, испр. и доп. М.: МГУЛ, 2001. 73 с.
12. Brown C. L. Forest as Energy Sours in the Year 2000 // Journal of Forestry. 1976. V. 74. № 1. P. 74–77.
13. Tissue culture as a tool for *in vitro*-Mass Propagation of aspen / K.M. Barocka, M. Baus, E. Lontke, F. Sievert // Z. Pflanzenzuchtg. 1985. P. 340–343.
14. Hasnain S. Tissue culture in forestry: economic and genetic potential // Forestry Chronicle. 1986. V. 62. № 4. P. 219–225.
15. Malabadi R. B., Nataraja K. Genetic transformation of Conifers: Applications in and Impacts on commercial Forestry // Transgenic plant Journal. 2007. T. 1(2). P. 289–313.
16. Lelu-Walter M.-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self-and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* through somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2008. V. 92. P. 31–45.
17. Микроразмножение хвойных в условиях *in vitro* / Е. В. Юшкова, Е. В. Никонорова, Н. А. Величко [и др.] // Лесной журнал. 2001. № 4. С. 129–132.
18. Плынская Ж. А., Аёшина Е. Н., Величко Н. А. Культивирование хвойных в условиях *in vitro* // Хвойные бореальной зоны. 2008. № 1-2. С. 68–70.
19. Коптина А. В., Сергеев Р. В., Шургин А. И. Технологии размножения хвойных пород в культуре *in vitro* // Лесохозяйственная информация. 2008. № 3-4. С. 40–42.
20. К вопросу изучения показателей качества семян хвойных растений, произрастающих в городских насаждениях (на примере г. Ижевска) / К. Е. Ведерников, И. Л. Бухарина, А. Н. Журавлева [и др.] // Успехи современной науки и образования. 2016. №10, Том 7. С. 113–116.

THE ROLE OF VEGETATIVE REPRODUCTION OF IN VITRO CULTURE CONIFEROUS PLANTS FOR FORESTRY AND GARDENING MANAGEMENT

V. V. Krasnoperova, Post-Graduate Student
FSBEI HE Izhevsk State Agricultural Academy
11, Studencheskaya st., Izhevsk 426069 Russia
E-mail: vlada-vk@bk.ru;

D. N. Vlasevsky, Senior Researcher
FSBSI Udmurt Scientific Research Institute
1, Lenina st., p. Pervomaysky, Zavyalovsky District, Udmurt Republic 427007 Russia
E-mail: ugniish@yandex.ru

ABSTRACT

The studies of 2016-2017 examine vegetative reproduction of coniferous plants by *in vitro* culture method. The model specimen for explant collection was selected on the base of Udmurt State University among green spaces with various environments in Izhevsk, the Udmurt Republic. Laboratory experiments were carried out under sterile conditions of meristem laboratory of Udmurt Scientific Research Institute. Buds and stem cuttings of adult coniferous plants were inserted into *in vitro* culture. Three reagents were used for the sterilization of coniferous plants tissues: 5% sodium hypochlorite solution (control); 5% alcohol solution of chlorhexidine; 6% chloramine solution. Explants were placed into nutrient media with the addition of antibiotic, sucrose and activated carbon: Murashige and Skoog medium (MS) (control); Anderson's medium; Woody Plant Medium (WPM). Growth hormones were added according to the scheme to each nutrient medium: 1) without hormones (control); 2) 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid); 3) 2,4-dinitrophenol; 4) 2,4-D + 6-BAP (6-benzylaminopurine); 5) 2,4-dinitrophenol + 6-BAP. As a result of the research, the technologies of vegetative reproduction of coniferous plants by modern biotechnological methods for use in forestry and gardening management were investigated. Sodium hypochlorite that affects the fungus and bacterial microflora and does not damage meristematic tissues of explants was determined as the best

sterilizing reagent. The best performance among presented media was shown by the WPM nutrient medium, where 64% of the cuttings continued their development. The combination of auxin and cytokinin hormones in nutrient medium accelerated callus formation for 5-10 days in comparison with other experiment variants.

Key words: coniferous plants, in vitro culture, sterilization, nutrient media, growth regulators, callusogenesis.

References

1. Bukharina I. L., Pashkova A. S., Vedernikov K. E. et al. Bioekologicheskie osobennosti khvoinykh rastenii v usloviyakh gorodskoi sredy (Bioecological aspects of coniferous plants under urban conditions), uch.-nauch. izd., Izhevsk, Udmurtskii un-t, 2015, 152 p.
2. Masalova L. I., Firsov A. N. Perspektivy ispol'zovaniya severoamerikanskikh khvoinykh introdutsentov dlya uluchsheniya mikroklimata naselennykh punktov (The prospect of North American invasive plants for the the improvement of communities microclimate), Biologicheskie osobennosti lekarstvennykh i aromatischeskikh rastenii i ikh rol' v meditsine, materialy Mezhdunar. nauch.-praktich. konf., Moskva, Shcherbinskaya tipografiya, 2016, pp. 114–118.
3. Korenev I. A. Perspektivy razvitiya mikroklonal'nogo razmnozheniya drevesnykh i nedrevesnykh rastenii v Kostromskoi oblasti (Development prospects of microclonal propagation of woody and non-woody plants in Kostromskaya Oblast), Trudy Sankt-Peterburgskogo NII lesnogo khozyaistva, 2011, Vyp. 1 (24), Ch. 2, pp. 52–55.
4. Costanza A., McCord S. Forest Biotechnology and Its Responsible Use, A Biotech Tree Primer by the Institute of Forest Biotechnology, Createspace, 2011, 30 p.
5. Gazizullin A. Kh. Sovremennoe sostoyanie lesnoi biotekhnologii v mire i v Rossii (The current state of forest biotechnology in the World and in Russia), Vestnik Kazanskogo GAU, 2012, No. 4 (26), pp. 94–98.
6. Zhigunov A. V. Primenenie biotekhnologii v lesnom khozyaistve Rossii (Implementation of biotechnologies into forest management of Russia), Lesnoi zhurnal, 2013, No. 2, pp. 27–35.
7. Alekseenko A. S., Pashkov E. V., Vedernikov K. E. et al. Fotosinteticheskaya aktivnost' khvoinykh rastenii v usloviyakh urbanoekosistem (na primere g. Izhevsk) (Photosynthetic activity of coniferous plants under urban ecosystem conditions), Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2013, No. 3, pp. 57–60.
8. Vidyakin A. I. Nauchnye osnovy vosstanovleniya i sokhraneniya lesnykh geneticheskikh resursov Rossii (Scientific basis of recovery and reduction of genetic resources in Russia), Sokhraneniye lesnykh geneticheskikh resursov Sibiri, materialy 4-go mezhdunar. soveshchaniya, 24-29 avgusta 2015 g., Barnaul, 2015, pp. 33–34.
9. Krasnoperova V. V. Ispol'zovanie khvoinykh rastenii v gorodskom ozelenenii (Coniferous plants in urban greening), Gorodskaya sreda: ekologicheskie i sotsial'nye aspekty, sb. statei nauch.-praktich. konf., 19 aprelya 2017 g., Izhevsk, 2017, pp. 135–139.
10. Lesnye kul'tury (Forest crops), uchenoe posobie, pod obshch. red. prof. A. R. Rodina, N. Nov-gorod, 2009, 464 p.
11. Kalashnikova E. A., Rodin A. R. Poluchenie posadochnogo materiala drevesnykh, tsvetochnykh i travyanistykh rastenii s ispol'zovaniem metodov kletochnoi i gennoi inzhenerii (Acquirability of planting materials of woody, flowering and herbaceous plants with the implementation of cell and genetic engineering methods), ucheb. posobie, izd. 2, ispr. i dop., Moscow, MGUL, 2001, 73 p.
12. Brown C. L. Forest as Energy Sours in the Year 2000, Journal of Forestry, 1976, V. 74, No. 1, pp. 74–77.
13. Barocka K. M., Baus M., Lontke E., Sievert F. Tissue culture as a tool for in vitro-Mass Propagation of aspen, Z. Pflanzentzucht, 1985, pp. 340–343.
14. Hasnain S. Tissue culture in forestry: economic and genetic potential, Forestry Chronicle, 1986, V. 62, No. 4, pp. 219–225.
15. Malabadi R. B., Nataraja K. Genetic transformation of Conifers, Applications in and Impacts on commercial Forestry, Transgenic plant Journal, 2007, T. 1(2), pp. 289–313.
16. Lelu-Walter M.-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self-and cross-pollinated seed families of Pinus sylvestris through somatic embryogenesis, Plant Cell Tiss Organ Cult., 2008, V. 92, pp. 31–45.
17. Yushkova E. V., Nikonorova E. V., Velichko N. A. et al. Mikrorazmnozhenie khvoinykh v usloviyakh in vitro (Micropropagation of coniferous under in vitro conditions), Lesnoi zhurnal, 2001, No. 4, pp. 129–132.
18. Plynskaya Zh. A., Aeshina E. N., Velichko N. A. Kul'tivirovanie khvoinykh v usloviyakh in vitro (Coniferous cultivation under in vitro conditions), Khvoinye boreal'noi zony, 2008, No. 1-2, pp. 68–70.
19. Koptina A. V., Sergeev R. V., Shurgin A. I. Tekhnologii razmnozheniya khvoinykh porod v kul'ture in vitro (Propagation technologies of in vitro culture coniferous), Lesokhozyaistvennaya informatsiya, 2008, No. 3-4, pp. 40–42.
20. Vedernikov K. E., Bukharina I. L., Zhuravleva A. N. et al. K voprosu izucheniya pokazatelei kachestva semyan khvoinykh rastenii, proizrastayushchikh v gorodskikh nasazhdeniyakh (na primere g. Izhevsk) (To the issue of quality parameters of coniferous seeds growing in urban green spaces), Uspekhi sovremennoi nauki i obrazovaniya, 2016, No. 10, Tom 7, pp. 113–116.