

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»

РЕФЕРАТ

по истории и философии науки (биологической науки)
на тему: «**Микроклональное размножение растений как современный
метод повышения эффективности семеноводства растений**»

Выполнил: аспирант
Беглов Сергей Михайлович

Рецензент: канд. с.-х. наук
Ткаченко О.В.

Научный руководитель: канд. с.-х.
наук **Ткаченко О.В.**

Саратов - 2015

Содержание

Введение

Раздел 1 Производство посадочного материала методом микроклонального размножения

1.1. Перспективы и преимущества применения микроклонального размножения

1.2. Методы микроклонального размножения растений *in vitro*

Раздел 2 Микроклональное размножение картофеля

2.1. Оздоровление посадочного материала методом апикальных меристем

2.2. Семеноводство картофеля с использованием оздоровленного посадочного материала

Заключение

Список литературы

Введение

Производство посадочного материала – один из важнейших этапов выращивания сельскохозяйственной продукции. Рентабельность производства во многом зависит от качества и стоимости посадочного материала. Один из наиболее перспективных методов оптимизации производства посадочного материала основан на применении современной технологии микрклонального размножения *in vitro*.

Микрклональное размножение - массовое бесполое размножение растений в культуре тканей и клеток, при котором возникающие формы растений генетически идентичны исходному экземпляру.

Во многих странах мира биоиндустрия микрклонального размножения поставлена на поточную промышленную основу и представлена десятками активно функционирующих предприятий. Например, во Франции 94% всей продукции цветочных культур получают методом культуры изолированных тканей. В США около 100 коммерческих предприятий получают посадочный материал декоративных, овощных, полевых, плодовых и лесных культур методом клонального микроразмножения. Ведущим производителем оздоровленного посадочного материала цветочных растений является Голландия, а подвоев яблони, сливы и персика – Италия.

В нашей стране также ведутся интенсивные работы по клональному микроразмножению растений, и в настоящее время многие НИИ и промышленные лаборатории разрабатывают и совершенствуют методы микроразмножения и оздоровления различных декоративных, плодовых, ягодных, овощных, кормовых и древесных культур. Хороших результатов достигли фирмы «Меристемные культуры» (г. Ставрополь), «Алчак» (г. Казань) и другие.

Дальнейшее повышение эффективности метода возможно за счет оптимизации методики клонирования и повышения коэффициента размноже-

ния растений, а также в направлении повышения способности пробирочных растений к адаптации к условиям *ex vitro*.

Сегодня на смену понятию «биологические науки» приходит термин «Живые системы» (Life sciences) - науки о живом и биотехнологии. Промышленное развитие этого направления считается важнейшей задачей с точки зрения развития наукоемких отраслей экономики (www.biorf.ru). Приказом президента Российской Федерации от 21 мая 2006 г. № 843 утвержден перечень приоритетных направлений развития науки, технологий и техники Российской Федерации, в том числе направление № 2 «Живые системы», а также № 6 «Рациональное природопользование». Кроме того, определен перечень критических технологий, включающий 33 перспективные области исследований (www.scincerf.ru).

В связи с выше сказанным, изучение поведения клеток растений *in vitro* приобретает особую актуальность.

Раздел 1 ПРОИЗВОДСТВО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА МЕТОДОМ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ

1.1. Перспективы и преимущества применения микроклонального размножения

В природе существует два способа размножения растений: половой (семенной) и вегетативный. Оба эти способа имеют как свои преимущества, так и недостатки.

К недостаткам семенного размножения относятся генетическая пестрота семенного материала и длительность ювенильного периода (<http://ru.wikipedia.org/wiki/>).

При вегетативном размножении генотип материнского растения сохраняется, а также сокращается длительность ювенильного периода. Однако большинство видов плохо размножается вегетативным способом.

Например, эффективность размножения, даже на ювенильной стадии многих видов древесных растений: дуба, сосны, ели, орехоплодных - не очень высока. Кроме того, с помощью черенкования невозможно размножать многие виды древесных растений в возрасте старше 10-15 лет. Для большинства видов, традиционно размножающихся вегетативно, трудно получить стандартный посадочный материал, так как существует возможность накопления и передачи инфекции. Операции по размножению с помощью прививок сложны и трудоемки.

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения - клонального микроразмножения - получения в условиях *in vitro* неполным путем растений, генетически идентичных исходному экземпляру (Бутенко Р.Г., 1999).

Микроклональное размножение - массовое бесполое размножение растений в культуре тканей и клеток, при котором возникающие формы растений генетически идентичны исходному экземпляру (Катаева Н.В., Бутенко Р.Г., 1983). В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность. Термин "клон" был предложен в 1903 году Уэбстером (от греческого *klon* - черенок или побег, пригодный для размножения растений). В соответствии с научной терминологией клонирование подразумевает получение идентичных организмов из единичных клеток.

Впервые микроклональное размножение провел французский ученый Жорж Морель на орхидеях в 50-х годах XX века. В своих работах он использовал технику культивирования апикальной меристемы растений в условиях *in vitro*. Растения, полученные таким образом, были свободны от вирусной инфекции.

В нашей стране исследования по оздоровлению растений методом меристем и по клональному микроразмножению были начаты в 60-х годах в лаборатории культуры тканей и морфогенеза Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Под руководством академика РАСХН Бутенко Р.Г. Были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы, фрезии и некоторых других растений (Роговая В.В. ftp://lib.herzen.spb.ru/text/rogovaia_gvozdev_5_13_291_302.pdf)

В настоящее время все большую актуальность приобретают различные методы микроклонального размножения сельскохозяйственных культур (прежде всего вегетативно размножаемых) в системе *in vitro*: размножение пазушными и адвентивными почками, непрямой морфогенез, соматический эмбриогенез.

Этот метод имеет ряд преимуществ, из которых наиболее значимое – возможность ускоренного получения генетически однородного, безвирусного посадочного материала. Оптимизация метода возможна в направлениях повышения коэффициента размножения микрорастений в культуре *in vitro*, а также улучшения адаптации растений к условиям *in vivo*. Кроме того, культура клеток и тканей *in vitro*, является удобной системой для изучения растительно-микробных взаимодействий .

Область применения микроразмножения довольно разнообразна и постоянно расширяется. Эта техника в первую очередь применяется для размножения взрослых древесных пород, особенно хвойных, которые очень плохо размножаются другими способами, и для сохранения редких и исчезающих видов лекарственных растений (Муромцев Г.С. 1990).

В настоящее время насчитывается более 200 видов древесных растений из 40 семейств, которые были размножены в лаборатории, а работы в этом направлении ведутся в научных учреждениях Москвы, Санкт-

Петербурга, Воронежа, Уфы, Новосибирска, Архангельска, Киева, Одессы, Ялты.

С биологической точки зрения клональное микроразмножение – очень сложный процесс, на который влияют разнообразные факторы: свойства самого растения, состав питательной среды, освещение, температура и др. Очевидно, что для каждого вида растений должна быть подобрана своя индивидуальная методика.

По мнению Шевелухи В.С., Калашниковой Е.А. (2003) этот метод имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- получение генетически однородного посадочного материала;
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
- высокий коэффициент размножения (10^5 - 10^6 - для травянистых, цветочных растений, 10^4 - 10^5 - для кустарниковых древесных растений и 10^4 - для хвойных);
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение всего года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- возможность автоматизации процесса выращивания.

1.2. Методы микроклонального размножения растений *in vitro*

Существует много методов клонального микроразмножения, а также различных их классификаций.

Н.В. Катаева и Р.Г. Бутенко (1983) выделяют два принципиально различных типа клонального микроразмножения:

1. Активация уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля).

2. Индукция возникновения почек или эмбриоидов *de novo* :

а) образование адвентивных побегов непосредственно тканями экспланта;

б) индукция соматического эмбриогенеза;

в) дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Основной метод, использующийся при клональном микроразмножении растений - активация развития уже существующих в растении меристем. Он основан на снятии апикального доминирования.

Этого можно достичь двумя путями: а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде; б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов.

Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопуридин (БАП) или 6-фурфуриламинопуридин (кинетин) и зеатин.

Полученные таким образом побеги отделяют от первичного экспланта и вновь самостоятельно культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков.

Часто в качестве экспланта используют верхушечные или пазушные почки, которые изолируют из побега и помещают на питательную среду с цитокининами. Образующиеся пучки побегов делят, при необходимости черенкуют и переносят на свежую питательную среду. После нескольких

пассажей, добавляя в питательную среду ауксины, побеги укореняют *in vitro*, а затем переносят в почву, где создают условия, способствующие адаптации растений.

Второй метод - индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта. Он основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и таким образом регенерировать целые растения. Можно добиться образования адвентивных почек почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковиц, сегментов корней и зачатков соцветий). Этот процесс происходит на питательных средах, содержащих цитокинины в соотношении с ауксинами 10:1 или 100:1. В качестве ауксина используют ИУК или НУК. Таким способом были размножены многие представители семейства лилейных, пасленовых, древесные растения (из зрелых и незрелых зародышей).

Третий метод, практикуемый при клональном микроразмножении, основывается на дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил название соматического эмбриогенеза. В отличие от развития *in vivo*, соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка и по своему внешнему виду напоминают биполярные структуры, у которых одновременно наблюдается развитие апикальных меристем стебля и корня. Согласно Стеварду, соматические зародыши проходят 3 стадии развития: глобулярную, сердцевидную, торпедовидную и в конечном итоге имеют тенденцию развития в проросток.

Наиболее впечатляющим применением метода соматического эмбриогенеза стало размножение гвинейской масличной пальмы (*Elaeis*

guineensis), масло которой широко используется при производстве маргарина и пищевого масла.

Масличная пальма в природе не образует побегов и боковых ростков, что затрудняет ее вегетативное размножение. Культивирование черенков *in vitro* также невозможно. Было решено получить скопления клеток недифференцированной ткани (калусы) путем дедифференцировки специфических тканей, а затем культивировать их до регенерации целых проростков. В первой культуральной среде калусы из фрагментов листьев развивались в течение 90 дней, при переносе во вторую и третью культуральные среды превращались в "эмбриониды". Эмбриониды размножались самопроизвольно, в течение месяца число эмбрионидов возрастало втрое, а за год из 10 эмбрионов можно было получить потомство численностью 500000 растений (Назарова Н.Н. 2006).

Формирование эмбрионидов в культуре тканей осуществляется в несколько этапов. Сначала происходит дифференциация клеток под влиянием ауксинов, добавленных в питательную среду (2,4-Д) и превращение их в эмбриональные. Получить эмбриониды из этих клеток можно уменьшая концентрацию ауксинов или исключая их из питательной среды. Соматические зародыши представляют собой полностью сформированные зародыши, из которых путем соответствующего капсулирования можно получить искусственные семена.

Четвертый метод клонального микроразмножения - дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Практически он мало используется с целью получения посадочного материала *in vitro*. Это связано с тем, что при частом пассировании каллусной ткани может изменяться ploидность регенерируемых растений, наблюдаются структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций. Наряду с генетическими изменениями отмечаются и морфологи-

ческие: низкорослость, неправильное жилкование листьев, образование укороченных междоузлий, пониженная устойчивость к болезням и вредителям. В то же время, некоторые недостатки этого метода в селекционной работе оборачиваются преимуществами.

Кроме того, в некоторых случаях он является единственно возможным способом размножения растений в культуре тканей. Через каллусную культуру успешно размножаются сахарная свекла, злаковые, представители рода *Brassica*, подсолнечник и другие культуры (Биотехнология http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell6_4.htm).

Процесс клонального микроразмножения можно разделить на 4 этапа:

1. Выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры.

2. Собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов.

3. Укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2°C, +10°C).

4. Выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Укоренение микропобегов проводят двумя способами:

- 1) выдерживание микропобегов в течение нескольких часов (2-24 ч) в стерильном концентрированном растворе ауксина (20-50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка);

- 2) непосредственное культивирование микропобегов в течение 3-4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1-5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта).

В последнее время предложен метод укоренения пробирочных растений в условиях гидропоники. Этот метод позволяет значительно упростить этап укоренения и одновременно получать растения, адаптированные к естественным условиям. Для картофеля возможно использовать безсубстратную гидропонику для получения мини-клубней. Затенение нижней части культуральных сосудов плотной черной материей или добавление в питательную среду активированного угля способствует укоренению микропобегов.

Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений – весна или начало лета.

Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом с длинными концами или специальным крючком. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85-90° С в течение 1-2 часов. Для большинства растений в качестве субстратов используют торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1); торф, песок, перлит (1:1:1). Исключение составляют семейство орхидных, для которых готовят субстрат, состоящий из сфагнового мха, смеси торфа, листьев бука или дуба, сосновой коры (1:1:1).

Приготовленным заранее почвенным субстратом заполняют пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения-регенеранты. Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20-22° С), освещенностью не более 5 тыс. люкс и влажностью 65-90%. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или

полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают до полной адаптации растений.

Через 20-30 дней после посадки хорошо укоренившиеся растения подкармливают растворами минеральных солей Кнудсона, Мурасиге и Скуга, Чеснокова, Кнопа (в зависимости от вида растений) или комплексным минеральным удобрением. По мере роста растений их рассаживают в большие емкости со свежим субстратом. Дальнейшее выращивание акклиматизированных растений соответствует принятой агротехнике выращивания для каждого индивидуального вида растений.

Процесс адаптации пробирочных растений к почвенным условиям является наиболее дорогостоящей и трудоемкой операцией. Нередко после пересадки растений в почву наблюдается остановка в росте, опадение листьев и гибель растений. Эти явления связаны, в первую очередь, с тем, что у пробирочных растений нарушена деятельность устьичного аппарата, вследствие чего происходит потеря большого количества воды. Во-вторых, у некоторых растений в условиях *in vitro* не происходит образования корневых волосков, что приводит, в свою очередь, к нарушению поглощения воды и минеральных солей из почвы. Поэтому целесообразно на третьем или четвертом этапах клонального микроразмножения применять искусственную микоризацию растений (для микотрофных), учитывая их положительную роль в снабжении растений минеральными и органическими питательными веществами, водой, биологически активными веществами, а также в защите растений от патогенов.

Индийскими учеными предложен простой метод предотвращения быстрого обезвоживания листьев растений, выращенных *in vitro*, во время их пересадки в полевые условия. Метод заключается в том, что листья в течение всего акклиматизационного периода следует опрыскивать 50%-ным водным раствором глицерина или смесью парафина, или жира в диэтило-

вом эфире (1:1). Применение этого метода помогает избежать длинных и затруднительных процессов закаливания пробирочных растений и обеспечивает 100%-ную их приживаемость (Биотехнология http://www.biotechnology.ru/pcell/pcell6_1.htm).

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области производства посадочного материала методом микроклонального размножения, остается много нерешенных проблем в отношении частных технологий для конкретных видов растений. Оптимизация метода микроклонального размножения возможна по ряду направлений, в том числе повышения коэффициента размножения микрорастений в культуре *in vitro*, а также улучшения адаптации растений к условиям *in vivo*. Кроме того, культура клеток и тканей *in vitro*, является удобной системой для изучения растительно-микробных взаимодействий (Волкогон В.В., и др. 2006).

Известно, что на рост растений в естественных условиях оказывают влияние не только абиотические, но и биотические факторы. Наиболее важными из них являются воздействие патогенных организмов, а также микробно-растительные взаимодействия с непатогенными организмами симбиотического и иного типа.

В настоящее время все более актуальным становится разработка систем интегрированной биологической защиты и стимуляции роста растений, не нарушающих экологического равновесия в почве и не загрязняющих окружающую среду. Эффективные компоненты этих систем - микробиологические препараты на основе живых клеток бактерий, грибов, актиномицетов и бактериофагов. Один из наиболее перспективных объектов для получения широкого спектра биопрепаратов различного назначения - ризосферные бактерии рода *Azospirillum* (Боронин А. М., Кочетков В.В. 2000). Данные грам-отрицательные микроорганизмы являются представителями ассоциативных азотфиксаторов, способных стимулировать рост и

развитие растений. В течение последних 25 лет они интенсивно исследуются мировым научным сообществом. В Институте биохимии и физиологии растений РАН азоспириллы являются одним из основных модельных объектов при проведении фундаментальных исследований молекулярных механизмов взаимодействия микроорганизмов и растений.

Взаимоотношения бактерий рода *Azospirillum* с растениями изучают во многих научных центрах. Одним из итогов этих исследований является положение о том, что взаимодействие “*Azospirillum* – корни растений” не выражено морфологически, однако при этом существует очень тесная пространственная и функциональная связь бактерий с рядом видов растений (Волкогон В.В., и др. 2006).

Особый интерес представляет изучение растительно-микробных взаимодействий в модельных условиях в культуре *in vitro*. По данным В.В. Волкогона с соавторами (2006), среди видов растений, у которых исследовали реакцию на интродукцию данных бактерий в корневую зону, определёнными особенностями отличается картофель. Бактерии рода *Azospirillum*, интродуцированные в зону корней картофеля в культуре *in vitro*, вызывают интенсивное развитие растений, усиленное корнеобразование и развитие стеблей, интенсивность окраски, а также поддержание растения в жизнеспособном состоянии длительное время. В данном случае можно говорить, что взаимоотношения между азоспириллами и растениями картофеля имеют гормонально-энергетический характер. Отличительной особенностью инокулированных растений является также формирование клубенькоподобных образований на корнях. Образование клубеньков индуцировалось всеми штаммами азоспирилл, независимо от их видовых особенностей.

Раздел 2 МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ КАРТОФЕЛЯ

2.1. Оздоровление посадочного материала методом апикальных меристем

Для оздоровления картофеля используется метод апикальных меристем. Опыт работы ведущих стран по картофелеводству показывает, что здоровые исходные растения для начала нового цикла воспроизводства в семеноводстве необходимо ежегодно отбирать в поле на репродукциях более низких, чем суперэлита. В дальнейшем клубни после проверки на отсутствие вирусной и бактериальной инфекций используются для микроклонального размножения в лабораторных условиях. Это позволяет максимально исключить факторы, неблагоприятно влияющие на соматическую и генетическую стабильность сорта. По этой же причине для вычленения ростков и микроклонального размножения используются безгормональные искусственные питательные среды, не создаются многолетние коллекции, не вводится в культуру картофель первых полевых репродукций, не применяются химио- и термотерапия (Пузанков О.П. 1990).

Сертификация качества семенного картофеля осуществляется государственными службами – семенной и карантинной инспекциями. Технология получения оздоровленного посадочного материала состоит из нескольких этапов:

Первый этап – получение оздоровленных пробирочных растений (первый год):

- подготовка клубней для вычленения верхушечных меристем или ростков из заведомо здоровых растений;
- стерилизация растительного материала для вычленения апикальных меристем или ростков в асептических условиях и культивирование их на искусственных питательных средах в помещении с контролируемым световым и температурным режимом;

- черенкование полученных растений-регенерантов по количеству междоузлий и посадка черенков на питательную среду по линиям;

- двукратная диагностика линий на зараженность вирусами и бактериями высокочувствительным иммуноферментным методом анализа (ИФА);

- диагностика линий на зараженность вириодом веретеновидности клубней;

- размножение регенерантов многократным черенкованием до необходимого количества (30 тыс. в год).

Второй этап – производство мини-клубней:

- посадка пробирочных растений в гидропонную теплицу;
- регулярный агрохимический анализ и корректировка питательных растворов;

- систематическая обработка растений от вредителей и болезней;
- анализ тепличных растений на вирусоносительство методом ИФА;
- регулярный сбор (2 - 3 раза в неделю) мини-клубней (2,2 - 2,4 млн шт. в год).

Третий этап – размножение семенного материала в полевых условиях:

- высадка мини-клубней в поле получение первой полевой репродукции картофеля (второй год);

- размножение семенного материала и получение супер-суперэлиты (третий год);

- размножение семенного материала и получение суперэлиты (четвертый год);

- проведение трех фитопрочисток в течение вегетационного периода картофеля с удалением больных растений и клубней;

- анализ растений на скрытую вирусную инфекцию серологическим методом.

Таким образом, технология получения оздоровленного картофеля от пробирки до потребителя рассчитана на четыре года.

2.1 Семеноводство картофеля с использованием оздоровленного посадочного материала

На примере фирмы «Алчак» (Татарстан) (alchak.ru) можно рассмотреть схему производства безвирусного семенного картофеля:

- в лабораторных условиях осуществляется введение в культуру *in vitro* оздоравливаемых сортов картофеля. Для этой цели из зоны роста почки специально отобранного материнского растения в стерильных условиях выделяется апикальная меристема, представляющая собой группу активно делящихся клеток, и высаживается в пробирки на питательную среду. Таким образом, происходит вычленение здоровой части растения, генетически идентичной исходному материнскому растению, и ее последующее вегетативное размножение.

- выросшие из меристемы растения проверяются на вирусы методом ИФА и разделяются на отдельные черенки в стерильных условиях ламинар-боксов. Черенки выращиваются в пробирках с питательной средой при специальном освещении на стеллажах-фитотронах.

- весной пробирочные растения картофеля высаживаются в искусственный торфо-песчаный грунт, обработанный «Базамид-Гранулятом», в летние теплицы-изоляторы, покрытые нетканым материалом типа «Агрил» («Пегас»), где обеспечивается защита картофеля от переносчиков вирусной инфекции (инсектов). Ежедекадно растения в теплицах подкармливают, опрыскивают инсектицидами и фунгицидами. Регулярно проводятся фиточистки и текущий контроль зараженности методом ИФА. Осенью из теплиц собираются тепличные миниклубни, полный клубневой анализ ко-

торых методом ИФА проводится в лаборатории Всероссийского НИИ картофельного хозяйства (ВНИИКХ).

- на следующий год тепличные миниклубни вручную высаживаются на специальном полевом участке, где никогда не было картофеля и который удален от ближайших посадок картофеля на 2-3 км (питомник 1-го года). На участке соблюдается вся технология выращивания картофеля с повышенной частотой обработок от вредителей и фитофторы.

После апробации поля Государственной семенной инспекцией, примерно 1-5 августа, у картофеля удаляется ботва. Ранняя уборка ботвы предотвращает заражение растений во время августовского лета тли и одновременно обеспечивает оптимальный для семенного картофеля размер клубней.

Описанный метод обеспечивает эффективное и рентабельное производство посадочного материала картофеля. Однако, продолжаются работы по оптимизации существующей методики.

В соответствии с методическими рекомендациями получения и оценки оздоровленного картофеля (Пузанков О.П. и др., 1988) способ микроклонального размножения картофеля включает: черенкование культивируемых *in vitro* растений; посадку черенков на питательную среду, содержащую макро- и микроэлементы по прописи Мурасиге-Скуга (MS), 30 г/л сахарозы, 5 мл/л хелата железа, 3 мг/л глицерина, 1 мг/л гетероауксина (ИУК), 7 г/л агар-агара, витамины по Уайту; культивирование растительного материала в специальных климатических комнатах; повторное черенкование; высадку полученных регенерантов в грунт.

Однако, при этом способе повторное черенкование пробирочных растений проводят только через 5-6 недель в зависимости от скороспелости сорта, что недостаточно для быстрого размножения новых и перспектив-

ных сортов из небольшой партии исходных. Приживаемость растений *in vitro*, выращенных на среде MS при пересадке в грунт, составляет 70-80%.

С целью повышения эффективности метода предлагаются различные способы. Один из них предложен учеными меристемной лаборатории "Биоклон" Пермской ГСХА (Патент РФ 2181942). Он заключается в том, что микрочеренкование осуществляют на питательную среду MS, дополнительно содержащую 0,5-1,0 мг/л коричной кислоты, обладающей ауксиновой и цитокининовой активностью. При добавлении в питательную среду MS 0,5-1,0 мг/л коричной кислоты происходит более быстрый рост стебля, формирование хорошо развитой корневой системы и образование большого числа междоузлий, что позволяет вести повторное микрочеренкование через 3-4 недели. В результате появляется возможность увеличить выход пробирочных растений через 3 месяца после посадки одного исходного на 0,2-1,5 тыс. штук в зависимости от сорта. Кроме того, добавление коричной кислоты увеличивает длину междоузлий, что более удобно при микрочеренковании. Корневая система меристемных растений картофеля *in vitro*, культивируемых на данной среде, более мощная и такие растения лучше укореняются в грунте (85-90%), в результате также повышается коэффициент размножения, что является важным для второго этапа в системе безвирусного семеноводства на безвирусной основе.

Предлагаемый способ позволяет повысить коэффициент размножения меристемных растений картофеля *in vitro* за 3 месяца последовательного черенкования на 0,2-1,5 тыс. штук от одного исходного за счет сокращения периода между повторными микрочеренкованиями, увеличения выхода микрочеренков и пробирочных растений и их лучшей приживаемости в грунте.

Заключение

Для производства оздоровленного посадочного материала используется биотехнологический метод культивирования апикальных меристем, являющийся этапом микроклонального размножения растений *in vitro*.

Рентабельность сельскохозяйственного производства во многом зависит от качества и стоимости посадочного материала. Повышение эффективности метода микроклонального размножения возможно за счет оптимизации методики клонирования и повышения коэффициента размножения растений. Кроме того, необходимо вести совершенствование этапа адаптации растений к условиям *ex vitro*, так как это наиболее трудоемкий и сложный процесс. Повысить устойчивость микрорастений к условиям естественного выращивания в грунте можно с помощью различных приемов, что позволит шире внедрять данный биотехнологический метод в практику сельского хозяйства.

Список литературы

1. alchak.ru
2. www.biorf.ru
3. www.scincerf.ru
4. <http://ru.wikipedia.org/wiki>
5. Биотехнология [электронный ресурс] / Кузьмина Н. Культуры растительных клеток. / Микроклональное размножение и оздоровление растений, 1995-2009. Режим доступа: Микроклональное размножение в биотехнологии растений http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell6_1.htm
6. Боронин А.М. Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, Пушинский государственный университет. / Боронин А.М. //., Кочетков В.В. Биологические препараты на основе псевдомонад АГРО XXI, №3, 2000 г.[электронный ресурс] режим доступа: [esobiotech.ru\plant growth...rhizobacteria\).htm](http://esobiotech.ru/plant_growth...rhizobacteria).htm)
7. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе: / Бутенко Р.Г. // Учеб. пособие.- М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.- 160 с.
8. Волкогон В.В., Димова С.Б., Мамчур А.Е. Особенности взаимоотношений бактерий рода *Azospirillum* с растениями картофеля, культивируемыми in vitro / Сільськогосподарська мікробіологія: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. 2006. вип.3. стр. 19-25.
9. Катаева Н.В., Клональное микроразмножение растений./ Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. М.: Наука, 1983. 96 с.
10. Муромцев Г.С. Основы сельскохозяйственной биотехнологий./ Муромцев Г.С. // Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Порофьев М.И. – М: Наука, 1990.

11. Назарова Н.Н. Культура столонов и регуляция роста растений и клубнеобразования у картофеля *in vitro* : автореферат дис.канд. биол./Назарова Н.Н.// - Душанбе-2006 – 23 с.

12. Патент РФ 2181942112. № 2181942 - Способ микроклонального размножения картофеля. Разумкова В.Н., Маслов И.Л. 10.05.2002. [электронный курс] Режим доступа: <http://ru-patent.info/21/80-84/2181942/html>

13. Пузанков О.П. Выращивание картофеля на оздоровленной основе. / Пузанков О.П. // Гришакович А.К. – Мн.: Урожай 1990.

14. Пузанков О.П. Методические указания по оздоровлению семенного картофеля./ Пузанков О.П. // Гришанович А.К. и др. Минск «Урожай», 1988. С. 29.

15. Роговая В. В. Особенности микроклонального размножения косточковых культур в условиях *in vitro*. / Роговая В. В. // Гвоздев М. А. [электронный ресурс] Режим доступа: ftp://lib.herzen.spb.ru/text/rogovaia_gvozdev_5_13_291_302.pdf

16. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология. / Шевелуха В. С. // Калашникова Е. А., Дегтярев С. В., и др. М.: Высшая школа, 2003. С.106.