

Леса России и хозяйство в них. 2023. № 2. С. 51–56.

Forests of Russia and economy in them. 2023. № 2. P. 51–56.

Научная статья

УДК 581.1:630.177.722

DOI: 10.51318/FRET.2023.30.85.006

ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ IN VITRO КЛЕНА МЕЛКОЛИСТНОГО (ACER MONO MAXIM.)

Анастасия Николаевна Марковская¹, Елена Геннадьевна Мартюшова²,
Павел Александрович Мартюшов³

^{1,2,3} Уральский государственный лесотехнический университет,
Екатеринбург, Россия

¹ markovskayaan@m.usfeu.ru, <http://orcid.org/0000-0002-5966-7825>

² eva88871@mail.ru

³ martyushovpa@m.usfeu.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6541-0375>

Аннотация. Для расширения ассортимента видов древесно-кустарниковых растений, используемых в озеленении, требуется посадочный материал. Однако многие виды плохо размножаются стандартными способами. Часто возникают сложности со сбором семян по причине периодичности семенных лет. Кроме того, сорта и формы древесно-кустарниковых растений не сохраняют свои свойства при семенном размножении.

Одним из путей решения проблемы обеспечения качественным посадочным материалом является микроклональное размножение. В то же время указанный способ размножения древесных растений сдерживается недостатком специализированных лабораторий по микроклональному размножению и отсутствием научно обоснованных методик его проведения для разных видов растений. Известно, что на микроклональное размножение растений влияет большое количество разнообразных факторов. В статье рассмотрены вопросы микроклонального размножения культуры in vitro клена мелколистного. Проанализированы такие факторы, как сезон года при сборе материала и стерилизация полученных образцов.

Ключевые слова: микроклонирование, микроклональное размножение, культура in vitro, размножение клена мелколистного

Scientific article

IN VITRO CULTURE OF SMALL-LEAVED MAPLE (ACER MONO MAXIM.)

Anastasia N. Markovskaya¹, Elena G. Martyushova²,
Pavel A. Martyushov³

^{1,2,3} Ural State Forest Engineering University, Yekaterinburg, Russia

¹ markovskayaan@m.usfeu.ru, <http://orcid.org/0000-0002-5966-7825>

² eva88871@mail.ru

³ martyushovpa@m.usfeu.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6541-0375>

Abstract. To expand the range of types of woody and shrubby plants used in landscaping, planting material is required. However, many species reproduce poorly in standard ways. There are often difficulties with collecting seeds due to the frequency of seed years. In addition, varieties and forms of woody and shrubby plants do not retain their properties during seed propagation.

One of the ways to solve the problem of providing high-quality planting material is microclonal reproduction. At the same time, this method of reproduction of woody plants is constrained by the lack of specialized laboratories for microclonal reproduction and the lack of scientifically sound methods for its implementation for different plant species. It is known that a large number of various factors affect the microclonal reproduction of plants. The article deals with the issues of microclonal reproduction of culture in vitro of small-leaved maple. Factors such as the season of the year when collecting the material and sterilization of the obtained samples are analyzed.

Keywords: microcloning, microclonal reproduction, in vitro culture, reproduction of small-leaved maple

Введение

Одним из приоритетных направлений в области озеленения является создание благоприятных условий для проживания и отдыха населения. Реализация данного направления возможна только при условии создания внутри городской застройки вокруг крупных мегаполисов зеленых насаждений, оказывающих положительное влияние на экологическую обстановку (Залесов, Хайретдинов, 2011; Хайретдинов, Залесов, 2011; Качество жизни..., 2013; Жилищно-коммунальное хозяйство..., 2017).

В то же время при формировании лесных парков и выращивании древесно-кустарниковой растительности внутри городской застройки следует учитывать негативное влияние на растения промышленных поллютантов и рекреации (Залесов и др., 2008; Залесов, Колтунов, 2009). Решить проблему создания эстетически привлекательных устойчивых объектов озеленения можно, только

вводя интродуценты, а также декоративные виды и формы аборигенных видов (Залесов и др., 2011; Оплетаев и др., 2016).

Особо следует отметить, что размножение различных видов древесно-кустарниковых растений связано с определенными сложностями. Так, из-за периодичности семенных лет многие виды сложно выращивать из семян. Кроме того, выращенные из семян растения не сохраняют своей специфической формы или сорта. При этом многие виды сложно размножаются вегетативным способом.

Указанное выше свидетельствует о перспективности микроклонального размножения декоративных видов деревьев и кустарников. В то же время следует отметить, что указанный способ выращивания посадочного материала сдерживается недостаточным количеством специализированных лабораторий и отсутствием научно-методических разработок по микроклональному размножению большинства видов древесных растений.

Последнее относится и к подбору образцов для микроклонального размножения.

Цель исследования – установление влияния сезона года при отборе исходного материала для микроклонального размножения на примере клена мелколистного (*Acer mono* Maxim).

Методы и принципы исследования

Термин «клон» (от греч. *clon* – отпрыск) был предложен Веббером в 1903 г. для вегетативно размножаемых растений. Таким образом, клональное микроразмножение – это использование практики *in vitro* для быстрого получения неполным способом размножения растений, идентичных исходному (Широков, 2012).

Объектами культуры *in vitro* могут быть как клетки, так и ткани, взятые из различных частей растений. Выбор экспланта для любого типа регенерации *in vitro* зависит от многочисленных факторов, таких как материнский генотип, особенности введения экспланта в стерильную культуру, состав питательных сред, условия и методы выращивания (Бутенко, 1999). Но главное, при выборе экспланта необходимо учитывать сезон года, фазы развития материнского растения при определении реакции экспланта на питательную среду (Практикум..., 2001).

Процесс микроклонального размножения включает 4 этапа: 1 этап – введение экспланта в культуру *in vitro*; 2 этап – непосредственно само микроразмножение; 3 этап – процесс укоренения микропобегов; 4 этап – осуществление выхода укорененных растений из стерильных условий в нестерильные.

Существует несколько способов микроклонального размножения:

а) индукция развития адвентивных побегов непосредственно из ткани экспланта, метод является очень эффективным, все признаки размножаемого образца полностью сохраняются;

б) развитие пазушных побегов, которое основано на снятии апикального доминирования, это наиболее надежный способ, заключающийся во введении полученной массы побегов на микрочеренки;

в) получение каллусной ткани с последующей индукцией органогенеза (Биотехнология..., 1989).

По данным Р. Г. Бутенко (1999), наиболее эффективный для оздоровления от вирусов, вириодов, микоплазм – способ культивирования меристем стебля или органов стеблевого происхождения. Поэтому в нашем исследовании мы выбрали способ черенкования органов стеблевого происхождения.

Объектами в данном исследовании были выбраны древесные растения семейства *Sapindaceae*. Представители: *Acer ginnala* Maxim., *Acer mono* Maxim., *Acer platanoides* L., *Acer tatáricum* L.

Опыт был начат в июле 2022 г. Обоснование выбора: климатическая устойчивость вида к условиям Екатеринбурга, отсутствие видимых повреждений болезнями и вредителями. Образцы для эксперимента были отобраны в саду лечебных культур имени профессора Л. И. Вигорова на территории Уральского сада лечебных культур (УСЛК) 1 и 2.

Важным условием отбора образцов является срезка побегов с верхней части кроны, так как для участия в эксперименте требуются только молодые побеги (текущего года). Также нужно учитывать, что для эксперимента требуются только верхушечные и боковые почки до третьего междоузлия.

После среза необходимых частей в лабораторных условиях начинается подготовка побегов к стерилизации: образцам присваивается номер и производится сегментирование до 1–2 см в зависимости от вида растения.

Стерилизация производится в два этапа. Первый этап заключается в очистке образцов от внешних загрязнений. Для этого образцы заливают мыльным раствором и держат в нем 1 ч. После мыльный раствор смывается проточной водой и далее образцы оставляют в дистилляте на 20 мин.

Второй этап производится в ламинар-боксе, который был заранее подготовлен. Здесь образцы подвергаются более тщательной стерилизации: спиртом, гидрохлоридом натрия. Промыв образцов проводится стерильным дистиллятом.

После стерилизации образцы иницируют на заранее подготовленную среду, в нашем случае среда Мурасиге – Скуга с добавлением фитогормонов. Подписывают, герметично закрывают пленкой и после окончания работы в ламинар-боксе переносят их в специальное помещение – растильню. В растильне образцы находятся при дополнительном

освещении и обогреве (световая фаза длится 16 ч, теневая – 8 ч; влажность воздуха равна 80 %, температура воздуха – 25 °С).

В данных условиях наблюдают за ходом роста образцов, а также определяют эффективность стерилизации. Инфекция обычно проявляется на 7–14-й день после инициации растения.

Основные результаты

Первые образцы были отобраны в июле в количестве 35 шт. Стандартная схема стерилизации показала, что 97,1 % образцов инфицированы, также было отмечено выделение фенолов (реакция растений на стресс). Для продолжения опыта необходимо внести коррективы в схему стерилизации.

Повторный отбор образцов был произведен в октябре в количестве 35 шт. Чистота образцов после стерилизации составила 100 %. На полученный результат повлияло внесение мертиолята в раствор гидрохлорида натрия. Выделение фенолов не обнаружено.

После успешной стерилизации особое внимание было уделено отзывчивости образцов на питательную среду. Интенсивный рост был отмечен у клена мелколистного (*Acer mono* Maxim). Полученные результаты показаны на фото (рис. 1, 2).

На 3-й день после инициации было отмечено набухание почек, на 13-й день рост почек был ярко выражен, а на 21-й день образовались листья раз-

мером до 1 см. Верхушечная почка в рост не тронулась (см. рис. 1). На 28-й день листья увеличились в размерах. На 29-й день была произведена пересадка образцов на питательную среду Мурасиге – Скуга с увеличением дозы фитогормонов. После пересадки был отмечен интенсивный рост листьев и образование новых побегов (см. рис. 2). Образцы *Acer mono* Maxim готовы для перехода на следующий этап.

Образцы *Acer ginnala* Maxim., *Acer platanoides* L., *Acer tataricum* L. также дали положительный отзыв на среду – началось образование каллуса. Но на 38-й день эксперимента каллусные ткани потемнели, и на 52-й день рост прекратился. Так как каллусные ткани, нередко и в пределах вида, требуют различных физических и химических условий выращивания *in vitro*, то для полного анализа образцов необходимо дополнительное исследование.

Итоги исследования можно проанализировать в нескольких направлениях. Предложенная схема стерилизации образцов дала положительные результаты, прежде всего на это повлияло внесение мертиолята в раствор гидрохлорида натрия.

Выбор среды, как показал эксперимент, был удачен. Все выбранные образцы начали активно расти. Но необходимо отметить, что *Acer mono* Maxim пошел по пути развития прямого морфогенеза, а образцы *Acer ginnala* Maxim., *Acer*



Рис. 1. После инициации
Fig. 1. After initiation



Рис. 2. После пересадки
Fig. 2. After the transplant

platanoïdes L., *Ácer tatáricum* L. – каллусогенеза. Можно предположить, что на данное обстоятельство повлияли увеличение дозы фитогормонов и генетическая особенность вида.

Влияние фенолов на рост растения также играет важную роль. При выделении фенолов происходит отравление органов растения, что и способствует угнетению роста. Поэтому очень важно учитывать сезон для отбора черенков.

Из вышеперечисленного можно сделать предварительный вывод, что перевод образцов на второй этап микроклонального размножения напрямую зависит от времени года сбора черенков, эффективного подбора стерилизации эксплантов, питательной среды, созданных условий для выращивания, а также соблюдения всех необходимых требований проведения исследования способом микроклонирования.

Заключение

1. Первый этап микроклонирования клена мелколистного (*A. mono* Maxim) прошел успешно, что подтверждается хорошими результатами.
2. Успех эксперимента объясняется правильным подбором способов стерилизации и питательной среды.
3. Наиболее удачным периодом отбора черенков для микроклонального размножения следует считать осенний период.
4. Образцы, отобранные в октябре, не выделяют фенолов, а следовательно, более устойчивы к стрессовым ситуациям.
5. На образование каллусной ткани влияют увеличение дозы фитогормонов и генетическая особенность вида.

Список источников

- Биотехнология растений: культура клеток / Г. П. Болвелл, К. Р. Вуд, Р. А. Гонзалес, Дж. М. Данвелл, Р. А. Диксон [и др.]. М. : Агропромиздат, 1989. 280 с.
- Бутенко Р. Г. Биология высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
- Жилищно-коммунальное хозяйство и качество жизни в XXI веке: экономические модели, новые технологии и пути управления / Л. С. Азаренков, Г. В. Астратова, Я. П. Силин [и др.]. М. ; Екатеринбург : Науковедение, 2017. 600 с.
- Залесов С. В., Колтунов Е. В. Корневые и ствольные гнили сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и березы повислой (*Betula pendula* Roth.) в Нижне-Исетском лесопарке г. Екатеринбурга // Аграрный вестник Урала. 2009. № 1 (55). С. 73–75.
- Залесов С. В., Хайретдинов А. Ф. Ландшафтные рубки в лесопарках. Екатеринбург : Урал. гос. лесотехн. ун-т, 2011. 176 с.
- Залесов С. В., Колтунов Е. В., Лапшевцев Р. Н. Основные факторы пораженности сосны корневыми и ствольными гнилями в городских лесопарках // Защита и карантин растений. 2008. № 2. С. 56–58.
- Залесов С. В., Платонов Е. П., Гусев А. В. Перспективность древесных интродуцентов для озеленения в условиях средней подзоны тайги Западной Сибири // Аграрный вестник Урала. 2011. № 4 (83). С. 56–58.
- Качество жизни : Проблемы и перспективы XXI века / Г. А. Астратова, А. В. Мехренцев, М. К. Хрущева [и др.]. Екатеринбург : Стратегия позитива™, 2013. 532 с.
- Оплетаев А. С., Залесов С. В., Кожевников А. П. Новая декоративная форма ели сибирской (*Picea obovate* Ledeb.) // Аграрный вестник Урала. 2016. № 6 (148). С. 40–44.
- Практикум по росту и устойчивости растений : учебное пособие / В. В. Полевой, Т. В. Чуркова, Л. А. Лугова [и др.]. СПб., 2001. 208 с.
- Хайретдинов А. Ф., Залесов С. В. Введение в лесоводство. Екатеринбург : Урал. гос. лесотехн. ун-т, 2011. 202 с.
- Широков А. И., Куюков Л. А. Основы биотехнологии растений. Н. Новгород, 2012. 49 с.

References

- Butenko R. G.* Biology of higher plants in vitro and biotechnologies based on them. Moscow : FBK-PRESS, 1999. 160 p.
- Housing and communal services and the quality of life in the XXI century: economic models, new technologies and ways of management / *L. S. Azarenkov, G. V. Astratova, Ya. P. Silin* [et al.]. Moscow ; Yekaterinburg : Publ. NauKovedenie. 2017. 600 p.
- Khayretdinov A. F., Zalesov S. V.* Introduction to forestry. Yekaterinburg : Ural State Forest Engineering University, 2011. 202 p.
- Opletaev A. S., Zalesov S. V., Kozhevnikov A. P.* A new decorative form of Siberian spruce (*Picea obovata* Ledeb.) // Agrarian Bulletin of the Urals. 2016. № 6 (148). P. 40–44. (In Russ.)
- Plant biotechnology: cell culture / *G. P. Bolwell, K. R. Wood, R. A. Gonzales, J. M. Dunwell, R. A. Dixon* [et al.]. Moscow : Agropromizdat, 1989. 280 p.
- Practicum on plant growth and resistance : Textbook / *V. V. Polevoy, T. V. Churikova, L. A. Lutova* [et al.]. Sankt-Petersburg, 2001. 208 p.
- Quality of life: Problems and prospects of the XXI century / *G. A. Astratova, A. V. Mehrentsev, M. K. Khru-shchev* [et al.]. Yekaterinburg : Publ. Strategy positiva™, 2013. 532 p.
- Shirokov A. I., Kuyukov L. A.* Fundamentals of plant biotechnology. Nizhny Novgorod, 2012. 49 p.
- Zalesov S. V., Khayretdinov A. F.* Landscape logging in forest parks. Yekaterinburg : Ural State Forest Engineering University, 2011. 176 p.
- Zalesov S. V., Koltunov E. V.* Root and stem rot of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and hanging birch (*Betula pendula* Roth.) in the Lower Iset forest park of Yekaterinburg // Agrarian Bulletin of the Urals. 2009. № 1 (55). P. 73–75. (In Russ.)
- Zalesov S. V., Koltunov E. V., Lapshevtsev R. N.* The main factors of pine infestation by root and stem rot in urban forest parks // Protection and quarantine of plants. 2008. № 2. P. 56–58. (In Russ.)
- Zalesov S. V., Platonov E. P., Gusev A. V.* Prospects of tree introducers for landscaping in the conditions of the middle taiga subzone of Western Siberia // Agrarian Bulletin of the Urals. 2011. № 4 (83). P. 56–58. (In Russ.)

Информация об авторах

А. Н. Марковская – аспирант,
markovskayaan@m.usfeu.ru, <http://orcid.org/0000-0002-5966-782>;
Е. Г. Мартюшова – аспирант,
eva88871@mail.ru;
П. А. Мартюшов – аспирант,
martyushovpa@m.usfeu.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6541-0375>.

Information about the authors

A. N. Markovskaya – postgraduate student,
markovskayaan@m.usfeu.ru, <http://orcid.org/0000-0002-5966-782>;
E. G. Martyushova – postgraduate student,
eva88871@mail.ru;
P. A. Martyushov – postgraduate student,
martyushovpa@m.usfeu.ru, <http://orcid.org/0000-0001-6541-0375>.

Статья поступила в редакцию 27.02.2023; принята к публикации 20.03.2023.
The article was submitted 27.02.2023; accepted for publication 20.03.2023.
