

Федеральное агентство лесного хозяйства Российской Федерации (Рослесхоз)
ФБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства
и механизации лесного хозяйства» (ВНИИЛМ)

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ВЫРАЩИВАНИЮ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА
ЛЕСНЫХ ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР *IN VITRO* И *IN VIVO***

Пушкино
2019

УДК 634.7
ББК 43.0
Л12

ISBN 978–5–94219–246–4

С. С. Макаров, С. А. Родин, А. И. Чудецкий

Методические рекомендации по выращиванию посадочного материала лесных ягодных культур *in vitro* и *in vivo* / С. С. Макаров, С. А. Родин, А. И. Чудецкий. – Пушкино : ВНИИЛМ, 2019. – 24 с.

Рецензент:

Е.А. Калашникова – профессор, доктор сельскохозяйственных наук

Методические рекомендации по выращиванию посадочного материала лесных ягодных культур предназначены для внедрения на предприятиях лесного хозяйства и могут быть использованы предприятиями других ведомств, занимающихся выращиванием ягодных растений, а также являются методическим руководством специалистов, занимающихся вопросами клонального микроразмножения, аспирантов и магистров биологических и сельскохозяйственных специальностей. Методические рекомендации посвящены клональному микроразмножению лесных ягодных растений, в них приведены особенности их размножения на всех этапах, а также выбору площадей для закладки плантаций, подготовке почвы для выращивания посадочного материала. Все методики изложены с использованием общепринятых символов и единиц измерения в системе СИ.

Работа рассмотрена и рекомендована к изданию научно – методической секцией по вопросам лесоводства и биологии ученого совета ФБУ ВНИИЛМ.

Протокол № 10 от 12.09.2019 г.

ISBN 978–5–94219–246–4

© С.С. Макаров, С.А. Родин, А.И. Чудецкий, 2019
© ФБУ ВНИИЛМ, 2019

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЕСНЫХ ЯГОДНЫХ РАСТЕНИЙ	5
1.1. Голубика полувысокая.....	5
1.2. Княженика арктическая	5
1.3. Жимолость съедобная.....	6
2. ВЫРАЩИВАНИЕ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА	7
2.1. Этапы клонального микроразмножения растений.....	7
2.2. Стерилизация исходного растительного материала и оборудования для проведения работ в условиях лаборатории.....	9
2.3. Введение в культуру <i>in vitro</i> голубики полувысокой	11
2.4. Клональное микроразмножение голубики полувысокой	11
2.5. Введение в культуру <i>in vitro</i> княженики арктической.....	15
2.6. Клональное микроразмножение княженики арктической	15
2.7. Введение в культуру <i>in vitro</i> жимолости съедобной.....	16
2.8. Клональное микроразмножение жимолости съедобной	16
2.9. Корнеобразование лесных ягодных растений	17
2.10. Адаптация лесных ягодных растений <i>in vitro</i> к нестерильным условиям <i>in vivo</i>	17
3. ВЫБОР И ПОДГОТОВКА УЧАСТКА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПЛАНТАЦИИ.....	19
4. ПОСАДКА.....	21
4.1. Голубика полувысокая.....	21
4.2. Княженика арктическая	21
4.3. Жимолость съедобная.....	22
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	23

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время прогрессирующее увеличение интенсивности воздействия техногенной и антропогенной нагрузки на природные экосистемы способствует изменениям их структуры в сторону деградации, что влечет за собой нарушение эколого-биологического и климатического равновесия средообразующих компонентов ландшафтов. В связи с этим вопрос о биологической рекультивации земель, вышедших из хозяйственного использования, и дальнейшем их использовании имеет важное экологическое и экономическое значение.

К таким землям относятся выработанные торфяные месторождения, площадь которых в России превышает 1 млн га. Выработанные торфяники (преимущественно после фрезерной добычи торфа) расположены, главным образом, вблизи населенных пунктов с частичным сохранением мелиоративной и дорожной сети. Хозяйственное освоение разнообразных по своим лесорастительным особенностям площадей таких земель до сих пор осуществляется не лучшим образом. Поскольку в отличие от минеральных почв остаточный слой торфа имеет низкие физико-химические, микробиологические, гидротермические свойства и повышенную токсичность, то основным направлением биологической рекультивации выработанных торфяных месторождений является лесохозяйственное [3].

На сегодняшний день одной из задач лесного хозяйства является обеспечение рентабельности использования побочной лесной продукции (недревесные ресурсы леса). Создание плантаций лесных ягодных растений на выработанных торфяниках является одним из факторов, повышающих эффективность работы отрасли. За последние десятилетия, как в России, так и за рубежом наблюдается повышение интереса к выращиванию лесных ягодных растений на нелесных землях, включая осушенные и выработанные торфяники. Успешность выращивания ягодных растений в промышленных масштабах при этом невозможна без использования сортового посадочного материала [13, 14].

1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЕСНЫХ ЯГОДНЫХ РАСТЕНИЙ

1.1. Голубика полувысокая

Голубика относится к семейству Ericaceae Juss. – вересковые, подсемейству Vaccinioideae Arnott – брусничные, роду Vaccinium L. (черника, голубика).

Полувысокие голубики являются межвидовыми гибридами видов *V. corymbosum* × *V. angustifolium*. Представлены кустарничками высотой 45-75 см и кустарниками – от 1 до 1,3 м. Достаточно морозостойки, особенно при хорошем снежном покрове, выдерживают температуру воздуха до –42°C [10]. К наиболее перспективным в хозяйственном отношении сортов полувысоких голубик относятся сорта Northblue, Northcountry и другие.

Northblue – среднеспелый сорт. Куст достигает высоты 3-4 фута (92-122 см). Ягоды крупные, темно-синие, с естественным ароматом голубики. Данный сорт был создан как альтернатива существующим сортам высокоурослой голубики для выращивания на бедных почвах в районах с низкими зимними температурами [18]. *Northblue* – продуктивный сорт: средний урожай 3-7 фунтов (1,36-3,18 кг) с куста (такие результаты получены при изучении сорта в штате Миннесота). Масса одной ягоды: средняя – 1,5 г, максимальная – 2,5 г [17].

Northcountry – ранний, среднеспелый сорт. Куст сильный, раскидистый, средневысокий, высокопродуктивный. Ягоды средне-синие, среднего размера, очень сладкие. *Northcountry* наиболее высоко ценится в регионах с холодным климатом и там, где случаются экстремальные перепады летне-зимних температур, то есть где практически невозможно выращивание других, имеющихся на сегодняшний день, сортов. *Northcountry* – более зимостойкий сорт, чем *Northblue*, благодаря тому, что его раскидистый куст лучше укрыт снегом. Высота куста – 50-80 см. Вкус умеренно сладкий. Средний урожай – 1,0-1,5 кг с куста. Масса одной ягоды: средняя – 0,6 г, максимальная – 1,5 г (это мелкоплодный сорт). Плодоношение продолжается 2-3 недели [17].

1.2. Княженика арктическая

Княженика арктическая (поленика, костяника арктическая, малина арктическая, мамура и др.) (*Rubus arcticus* L.) относится к роду малин (*Rubus* L.) семейства Розоцветных (*Rosaceae* Endl.) [6, 15, 16, 19].

Княженика – многолетнее травянистое растение высотой 10-35 см. Надземные побеги княженики, состоящие из 5-9 междоузлий, ветвятся, дают боковые побеги, в результате все растение приобретает форму куста. Листья тройчатые, морщинистые, с черешками и двумя прилистниками. Цветет в конце июня-начале июля розовыми цветками. Цветки чаще всего обоеполые, одиночные, до 2 (3,7) см в диаметре. Изредка встречаются однополые цветки, т.е. наблюдается двудомность. Период цветения растянут. Княженика является медоносом, опыляется шмелями и пчёлами [19]. Плоды созревают в июле-сентябре. Плод – сборная костянка из 25-50 плодиков, имеет сходство с ягодами малины. Масса плода 1-2 г. Цвет плодов – от темно-вишневого до пурпурового с сизоватым налетом. Надземные побеги на зиму ежегодно отмирают. Подземные части княженики (корни, подземные побеги и почки возобновления) остаются живыми многие годы. Корни княженики лишены корневых волосков, а питание их происходит при участии нитей гриба (микоризы), оплетающих снаружи молодые окончания корешков и проникающих внутрь клеток последних.

К наиболее известным сорта княженики арктической относятся сорта Anna, Sofia, Astra, Beata, Aura и другие.

1.3. Жимолость съедобная

Род жимолость (*Lonicera* L.) широко представлен в растительном мире и насчитывает более 200 видов. Различия между видами, возможно недостаточно существенные с точки зрения систематики растений, тем не менее определяют их разную значимость для введения в культуру [10].

Жимолость съедобная (*L. edulis* Turcz. Ex Freyn) – небольшой куст высотой 0,5-1,2 м, скелетные ветви тонкие, бурые, часто поникающие. Побеги тонкие, не густо опушенные. Листья узкие, продолговато-эллиптические или ланцетные. Цветки бледно-желтые, с пыльниками, далеко выставляющимися из венчика. Плоды удлиненные, разнообразной формы, кисло-сладкие, часто с горчинкой. Созревают в июне [9, 12]. Жимолость обладает некоторой теневыносливостью, произрастая в подлеске хвойных и смешанных лесов, но лучше растет и плодоносит на лугах и опушках, т.е. в условиях хорошей освещенности. В целом, жимолость съедобная отличается высокой зимостойкостью как в местах естественного произрастания, так и в новых для нее регионах страны. К началу цветения жимолости сумма положительных температур составляет 242-336°. Созревание ранних сортов и форм отмечено при сумме положительных температур 700-750°, среднего срока созревания – 780-820°, поздних – 830-917° [7, 8, 12].

К наиболее известным сортам жимолости относятся: Андерма, Морена, Синяя Птица, Ленинградский Великан, Гжелка и другие.

Морена – межвидовой гибрид (*L. kamtschatica* L. × *turczaninowii*), раннеспелый сорт. Кусты средние по интенсивности роста, достигают высоты 1,6-1,7 м. и диаметра 1,7-1,8 м. Крона овальная, приземистая, стойкая к загущению. Листья очень крупные удлинено-овальные с клиновидной основой. Поверхность листовой пластинки светло-зеленого цвета, плотная по своей структуре. Побеги на кусте слабоизогнутые, без опушения, бурозеленой окраски. Благодаря своей красивой и изящной кроне сорт часто используется для озеленения территорий. Плоды достигают 2,6-2,8 см в длину и 1-1,1 см в диаметре. Вес одного плода – 1,7-3,6 г. Спелые плоды имеют удлинено-кувшинную форму, тонкую полупрозрачную кожуру и слабо бугристую поверхность. Полностью вызревшие ягоды имеют сине-голубой цвет и сильный восковой налет на своей поверхности. Сорт самоплодный, зимостойкий с низкой осыпаемостью. Урожайность – 1,3-1,6 кг с куста [10].

Андерма – жимолость алтайская (*Lonicera altaica* Pall.) – скороплодный, высокоурожайный сорт. Куст средних размеров (до 40 см в высоту). Плоды расположены компактными группами, прикрепление к ветвям среднее, осыпаемости нет. Плоды крупные, сочные, удлинено-овальной формы, с округленной верхушкой, темно-синего цвета с восковым налетом. Вкус плодов кисло-сладкий. Для посадки рекомендуется выбирать солнечные места с хорошо удобренной землей. Кусты высаживают на расстоянии не менее 1,5 м друг от друга. Урожайность – 1,4 кг с куста [10].

2. ВЫРАЩИВАНИЕ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА

2.1. Этапы клонального микроразмножения растений

Клеточная биотехнология растений базируется на способности изолированных клеток к размножению, дифференцировке и регенерации растений в условиях *in vitro*. Для получения оздоровленного посадочного материала применяют метод клонального микроразмножения, который широко используется для размножения цветочных, декоративных, лекарственных и других растений. Вместе с тем, такие технологии предусматривают использование стандартного оборудования и препаратов, а также возможность проводить исследования круглогодично, независимо от по-

годных условий, занимая небольшие площади помещения. Эти преимущества имеют непосредственное отношение к культуре клеток и тканей и органов растений. Важнейшее значение имеет выяснение механизма морфогенеза *in vitro*, регенерации и лежащих в их основе процессов [4, 11].

Технология клонального микроразмножения состоит из 4 этапов:

- 1. Введение в культуру *in vitro*** – выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры;
- 2. Собственно микроразмножение** – получение максимального количества меристематических клонов;
- 3. Укоренение размноженных микропобегов;**
- 4. Адаптация растений-регенерантов в нестерильных условиях выращивания.**

Для успешного культивирования растительных органов, тканей и клеток необходимо соблюдение строгой стерильности, т.к. на искусственных питательных средах одновременно могут развиваться колонии микроорганизмов. В результате этого может существенно изменяться состав питательной среды, и, кроме того, легко повреждаются изолированные клетки, ткани и органы растений. В связи с этим все работы по введению в культуру и дальнейшие пассажи (пересадки) растений *in vitro* проводят в стерильных помещениях в ламинар-боксах. После стерилизации растительные объекты следует тщательно отмыть от стерилизующих веществ многократным ополаскиванием дистиллированной водой. Ополаскивание проводят при 5-7-кратной смене стерильной воды [4].

На этапе «введение в культуру» свободный от вирусов посадочный материал для клонального микроразмножения растений можно получить методом культуры изолированных апикальных меристем. Апикальные меристемы являются наиболее здоровой, свободной от вирусов частью растений и представляют собой конус активно делящихся клеток высотой 0,1 мм (100 микрон) и шириной 0,25 мм. Однако, собственно меристему трудно изолировать без повреждений, в связи с чем отделяют эксплант, представляющий из себя собственно меристему и 1-2 листовых примордия (апексы размером 100-250 мкм).

На этапе «собственно микроразмножение» при культивировании микрорастений на питательной среде с содержанием цитокинина 6-БАП 0,5 мг/л или препарата Цитодеф 0,2 мг/л происходит снятие апикального доминирования, что приводит к активации развития пазушных меристем, которые в дальнейшем развиваются в микропобеги. Полученные адвентивные микропобеги отделяют от материнского экспланта и самостоятель-

но культивируют на новой питательной среде. Для увеличения коэффициента размножения применяют микрочеренкование – деление побегов на черенки, содержащих одну или две пазушные почки [1, 2].

Укоренение побегов – наиболее сложный этап клонального микро-размножения, от которого зависит эффективность предлагаемой технологии. На данном этапе необходимо создать наиболее благоприятный состав питательной среды, обеспечивающий получение высокого процента укорененных микропобегов, для чего уменьшают концентрацию минеральных солей, сахарозы, а также исключают из состава питательной среды цитокинины. Основным регуляторным фактором корнеобразования является присутствие в составе питательной среды ауксинов, среди которых наиболее часто используют ИМК или ИУК в концентрациях от 1 до 5 мг/л. Выбор гормона и его концентрации зависит от видовых и сортовых особенностей исследуемых растений.

Укоренившиеся микропобеги высаживают в условия грунта для адаптации. Адаптация растений-регенерантов к нестерильным почвенным условиям является самым ответственным этапом и заключительным процессом клонального микро-размножения. Для адаптации пробирочных растений в почвогрунт самым благоприятным временем года считается период со 2-й декады марта до 1-й декады июня. В этот период растения с хорошо развитой корневой системой и 5-7 листьями способны адаптироваться к условиям *ex vitro*.

2.2. Стерилизация исходного растительного материала и оборудования для проведения работ в условиях лаборатории

Для успешного культивирования растительных органов, тканей и клеток необходимо соблюдение строгой стерильности, так как на искусственных питательных средах одновременно могут развиваться колонии микроорганизмов. В результате развития микроорганизмов может существенно изменяться состав питательной среды, а кроме того, легко повреждаются изолированные клетки, ткани и органы растений. Поэтому все работы по введению в культуру и дальнейшие пассажи (пересадки) растений *in vitro* проводят в стерильных помещениях в ламинар-боксах.

Стерилизацию ламинар-бокса проводят следующим образом. Сначала протирают внутреннюю рабочую поверхность бокса 70% этиловым спиртом, затем размещают там все необходимое для работы (спиртовку, спички, стаканчик с 96% этиловым спиртом, стерильную посуду и инстру-

менты, а для выделения меристем – еще и бинокляр). Накануне проведения работ, вечером, в боксе включают бактерицидную ультрафиолетовую лампу. За 2 часа до начала работ рабочую поверхность вновь протирают 70% спиртом и опять облучают ультрафиолетовой лампой. Работающий должен вымыть руки с мылом и протереть их спиртом, надеть стерильный халат, завязать волосы стерильной марлевой косынкой.

Стерилизацию лабораторной посуды осуществляют сухим жаром в сушильном шкафу или влажным жаром в автоклаве. Перед стерилизацией посуду тщательно моют с использованием детергентов (порошок «Прогресс» и др.), а также раствора двуххромовокислого калия в серной кислоте (хромпик). Вымытую посуду ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Во избежание заражения простерилизованных предметов из воздуха, их заворачивают в крафт-бумагу и помещают в сушильный шкаф, где поддерживают температуру +160°C в течение 2 часов (с момента установления нужной температуры). При таком режиме сушки погибают бактерии и их споры. Еще более эффективно проходит стерилизация влажным жаром под давлением в автоклаве. Чистую посуду тщательно заворачивают в фольгу или крафт-бумагу и автоклавируют в течение 25-30 мин при давлении 2 атм. Так же стерилизуют ватные пробки, халаты и т.д.

Стерилизацию инструментов можно проводить двумя способами: 1) в сушильном шкафу при +140°C в течение 2 часов или 2) кипячением. Нельзя подвергать металлические инструменты автоклавированию, так как под действием пара они подвергаются коррозии. Непосредственно перед началом работы, а также в ее процессе инструменты стерилизуют, помещая их в стаканчик, содержащий 96% спирт, после чего инструменты обжигают в пламени спиртовки. Стерильные инструменты используют только для одноразовой манипуляции, а затем вновь обжигают.

Стерилизация питательных сред осуществляется автоклавированием (паром под давлением). Питательную среду разливают по пробиркам (1/3 объема), закрывают ватными пробками или фольгой, завертывают в оберточную бумагу и автоклавируют при температуре +120°C и давлении 1 атм. в течение 18-20 мин.

2.3. Введение в культуру *in vitro* голубики полувысокой

Отобранные в конце июня–начале июля зеленые черенки голубики полувысокой необходимо промыть под проточной водой с применением моющего средства и удалить листочки. Затем следует нарезать побеги на двухпочковые черенки, которые помещают в марлевые мешочки и проводят стерилизацию 0,1%-ным раствором сулемы в течение 3 минут или экомстерилизатором бесхлорным в течение 4-5 минут. После этого материал промывают дистиллированной водой, меняя ее 5-6 раз. Затем стерильные черенки погружают на 1 минуту в относительный спирт, а материал снова промывают дистиллированной стерильной водой, меняя ее 4 раза. Далее черенки извлекают из мешочка с помощью стерильного пинцета и кладут их на матрасик. Отрезают базальную часть черенка и переносят его на питательную среду WPM. Пробирки закрывают пленкой.

Для клонального микроразмножения голубики также можно использовать и другие экспланты – латеральные и апикальные почки зрелых и молодых побегов. Почки с кусочком стебля длиной 1-2 см промывают в проточной воде, затем 10-20 мин – в дистиллированной воде (рис. 1). После этого зрелые почки стерилизуют 0,1%-ным раствором сулемы в течение 15 минут, молодые – в течение 10 минут. После стерилизации материал промывают стерильной водой 3 раза. Через 30-40 суток отмечается формирование побегов.

2.4. Клональное микроразмножение голубики полувысокой

На этапе «собственно размножение» голубики полувысокой в условиях ламинар-бокса необходимо достать исходные растения из культурального сосуда и положить их на стерильный матрасик. При помощи скальпеля и пинцета следует разделить растения на микрочеренки длиной 1,0 см, удаляя нижние листочки голубики узколистной, и пересадить на питательную среду 1/4 минеральных солей по прописи WPM с добавлением цитокинина 6-БАП 0,2 мг/л или 2ip 2,0 мг/л. Уровень pH среды должен находиться в пределах 4,8-5,3.

После этого горлышко культурального сосуда необходимо закрыть пищевой пленкой и поставить в световую комнату, где поддерживается освещение 6000 лк, 16-часовой фотопериод, температура +25°C и влажность воздуха 70%. Культивирование проводят в течение 48-65 суток. Полученный в конце пассажа биоматериал вновь используют для дальнейшего размножения в условиях *in vitro*.

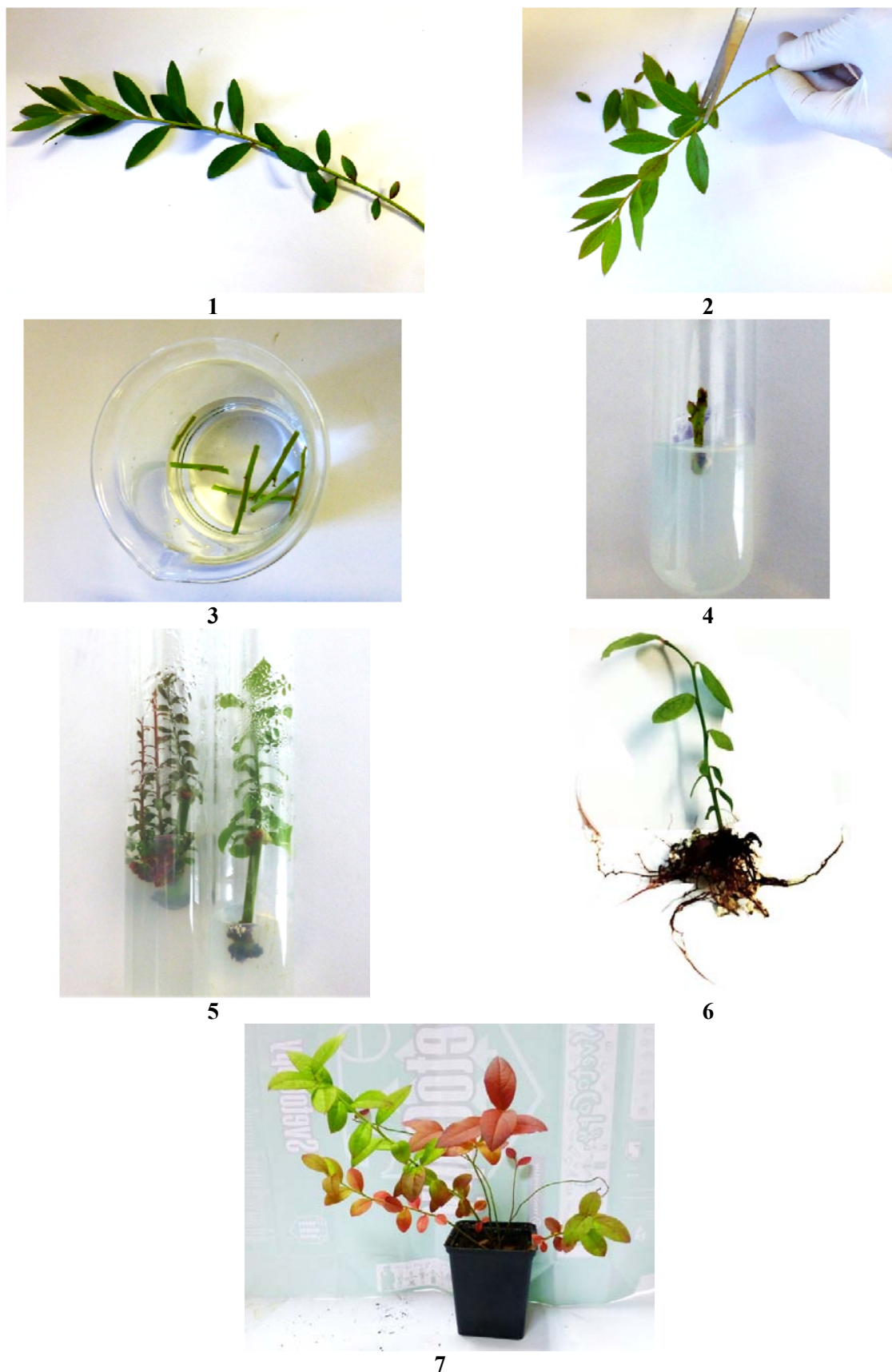


Рис. 1. Клональное микроразмножение голубики:

1 – растения голубики; 2 – черенкование; 3 – стерилизация эксплантов;
 4 – культивирование эксплантов на питательной среде; 5 – образование побегов;
 6 – ризогенез микрорастений; 7 – адаптированные микрорастения в нестерильных условиях

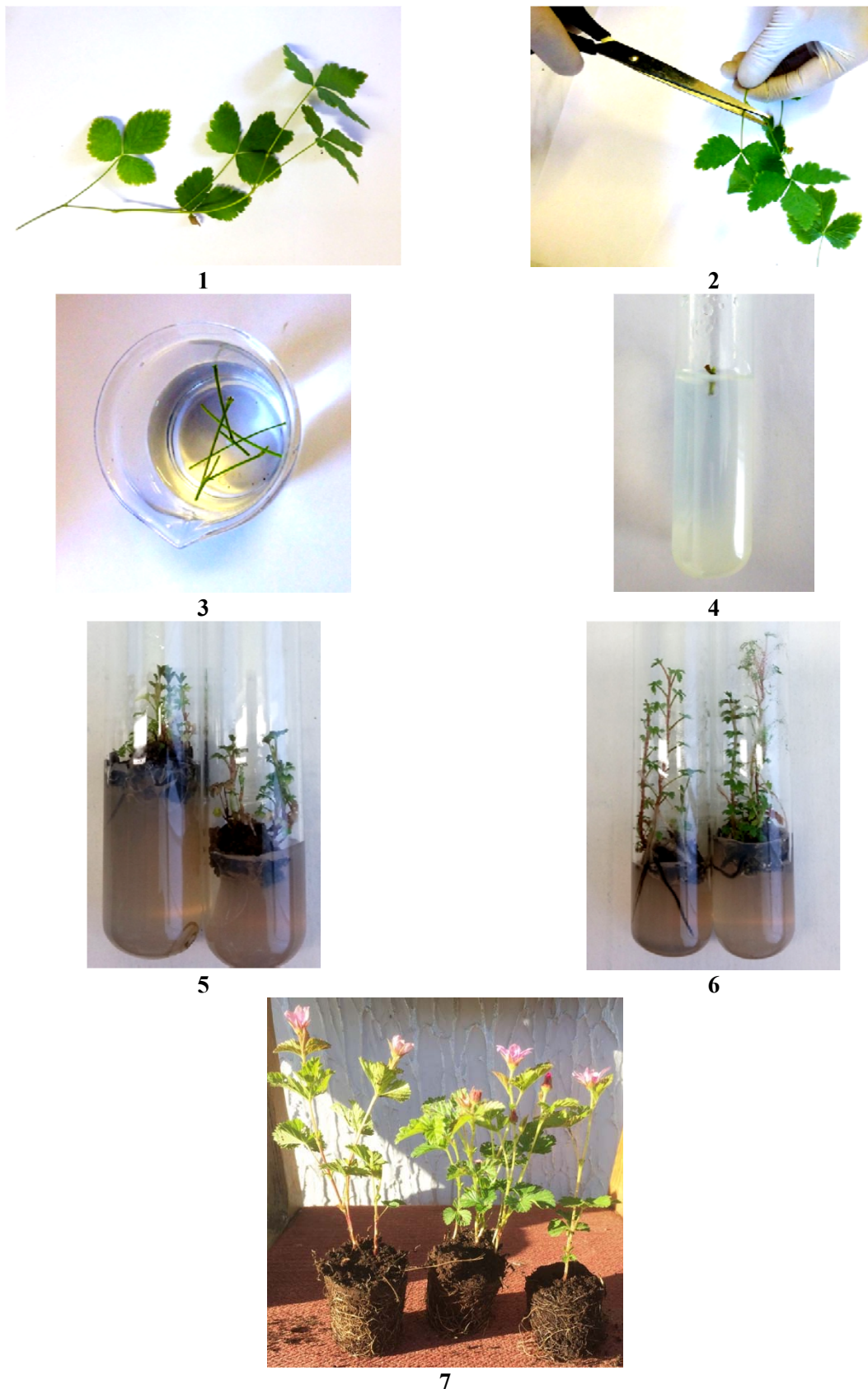


Рис. 2. Клональное микроразмножение княженики арктической:
 1 – растения княженики; 2 – черенкование; 3 – стерилизация эксплантов;
 4 – культивирование эксплантов на питательной среде; 5 – образование побегов;
 6 – ризогенез микрорастений; 7 – адаптированные микрорастения в нестерильных условиях

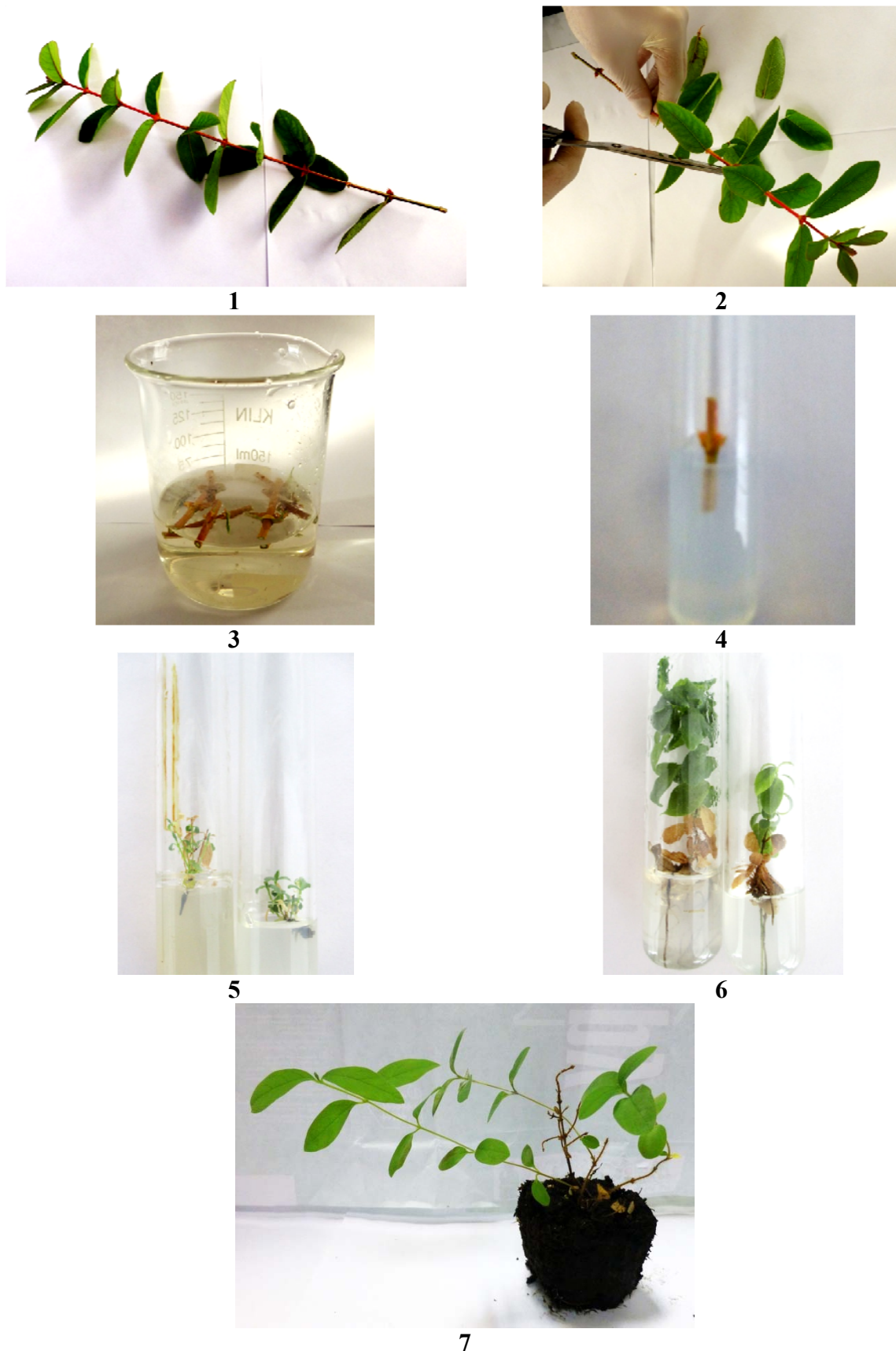


Рис. 3. Клональное микроразмножение жимолости:

1 – растения жимолости; 2 – черенкование; 3 – стерилизация эксплантов;
 4 – культивирование эксплантов на питательной среде; 5 – образование побегов;
 6 – ризогенез микрорастений; 7 – адаптированные микрорастения в нестерильных условиях

2.5. Введение в культуру *in vitro* княженики арктической

На этапе «введение в культуру» эксплант растения княженики арктической необходимо поместить на питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением цитокинина 6-БАП в концентрации 0,5-1 мг/л. С целью повышения эффективности оздоровления применяют сочетание метода культуры изолированных меристем с термотерапией и химиотерапией. Полученные из апикальных меристем растения-регенеранты размножают методом микрочеренкования.

В начале работы исходные растения необходимо тщательно промыть с мылом в теплой проточной воде. После чего их ополаскивают дистиллированной водой и опускают на 1 минуту в абсолютный спирт, а затем – в основной стерилизующий раствор на 10 минут. Далее растительные объекты тщательно отмывают от стерилизующего вещества путем многократного ополаскивания дистиллированной водой при 5-7-кратной смене стерильной воды.

В условиях ламинар-бокса с помощью стерильных инструментов (препаровальной иглы) под бинокулярной лупой из почек растений необходимо изолировать апикальную меристему. Для этого простерилизованные почки нужно поместить в чашку Петри на фильтровальную бумагу и добавить несколько капель стерильной воды для предупреждения подсыхания. Изолирование проводят путем удаления покровных листочков и последовательного обнажения боковых и верхушечных меристем с примордиальными листочками (рис. 2). После изолирования, меристему следует перенести на поверхность питательной среды в пробирку с помощью стерильной препаровальной иглы, слегка вдавив меристему в субстрат. Пробирки закрывают ватными пробками под пламенем спиртовки.

Введенные в культуру *in vitro* экспланты в пробирках следует поместить в световую комнату при 16-часовом световом дне, освещенности 1,5-2 тыс. лк, температуре +23...+26°C и относительной влажности воздуха 70-75%.

2.6. Клональное микроразмножение княженики арктической

На этапе «собственно микроразмножение» княженики арктической в условиях ламинар-бокса необходимо достать исходные растения из культурального сосуда и положить их на стерильный матрасик. При помощи скальпеля и пинцета следует разделить растения княженики на микроче-

ренки с 2-3 междоузлиями и пересадить на питательную среду 1/2 минеральных солей по прописи MS с добавлением цитокинина 6-БАП 0,5 мг/л или препарата Цитодеф 0,2 мг/л. Уровень pH среды должен находиться в пределах 5,3-5,5.

После этого культуральный сосуд необходимо герметизировать пищевой пленкой и поставить в световую комнату, где поддерживается освещение 2500-3000 лк, 16-часовой фотопериод, температура +25°C и влажность воздуха 70%. Культивирование проводят в течение 38-54 суток. Полученный биоматериал вновь используют для дальнейшего размножения в условиях *in vitro*.

2.7. Введение в культуру *in vitro* жимолости съедобной

Для успешного введения в культуру жимолости съедобной необходимо учитывать сезонность физиологических процессов растений. Благоприятная регенерация меристематических эксплантов переходит в фазу активного роста побегов, которая у жимолости совпадает с фазой бутонизации. В связи с этим необходимо взять черенки длиной 15-20 см с зимующих растений жимолости в марте–апреле, промыть их водой с моющим средством и оставить в воде при температуре +20°C на 14 суток (рис. 3).

После того, как побеги отрастут, проводят введение в культуру *in vitro*. В качестве основного стерилизатора рекомендуется использовать экостерилизатор бесхлорный. В качестве эксплантов для культивирования жимолости в стекле используют узлы зеленых побегов, а также конус нарастания.

2.8. Клональное микроразмножение жимолости съедобной

На этапе «собственно микроразмножение» жимолости съедобной в условиях ламинар-бокса необходимо достать исходные растения из культурального сосуда и положить их на стерильный матрасик. При помощи скальпеля и пинцета нужно разделить растения на микрочеренки длиной 1,0-1,5 см с 2-3 междоузлиями, удаляя нижние листочки жимолости, и пересадить их на питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи QL + 6-БАП 0,5 мг/л или минеральные соли по прописи MS + 6-БАП 0,5 мг/л. Уровень pH среды должен находиться в пределах 5,8-5,9.

После этого культуральный сосуд необходимо герметизировать пищевой пленкой и поставить его в световую комнату, где поддерживается освещение 2500-2800 лк, 16-часовой фотопериод, температура +23°C и относительная влажность воздуха 80%. Культивирование проводят в течение

25-30 суток. Полученный в конце пассажа биоматериал вновь используют для дальнейшего размножения в условиях *in vitro*.

2.9. Корнеобразование лесных ягодных растений

На этапе корнеобразования лесных ягодных растений (голубика полувысокая, княженика арктическая, жимолость съедобная) в условиях ламинар-бокса необходимо достать исходные растения из культурального сосуда и положить их на стерильный матрасик. При помощи скальпеля и пинцета следует разделить растения на микрочеренки длиной 1,0-1,5 см с двумя междоузлиями, удаляя нижние листочки, и пересадить их на питательную среду, содержащую ауксины.

После этого горлышко сосуда необходимо закрыть пищевой пленкой и поставить в световую комнату, где поддерживается освещение 2500-3000 лк, 16-часовой фотопериод, температура +25°C и относительная влажность воздуха 80%. Культивирование проводят в течение 30-50 суток. Полученный в конце пассажа биоматериал вновь используют для дальнейшего размножения в условиях *in vitro*.

Основные компоненты питательной среды, необходимые для укоренения растений *in vitro*, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Минеральная основа и ауксины, применяемые для укоренения микропобегов лесных ягодных растений в условиях *in vitro*

Вид ягодной культуры	Наименование питательной среды	Вид ауксина	Концентрация ауксина, мг/л
Голубика полувысокая	WPM	ИМК	0,2-1,0
		ИУК	0,5
Княженика арктическая	MS	ИМК	0,5-1,0
Жимолость съедобная	QL; MS	ИМК	0,5

2.10. Адаптация лесных ягодных растений *in vitro* к нестерильным условиям *in vivo*

Следующий этап размножения оздоровленного посадочного материала – перевод пробирочных растений из стерильных условий в нестерильные (*in vivo*) – проводится в условиях теплицы и является наиболее критическим и наименее отработанным. На данном этапе теряется огромное количество уже размноженного материала, в итоге снижается коэффициент размножения, возрастает себестоимость оздоровленных растений.

Оздоровленные пробирочные растения длительное время находились в условиях стерильности (*in vitro*) и наиболее благоприятного для них сочетания температуры, влажности, освещения, обеспечения питательными элементами. При переходе в нестерильные условия (*in vivo*) растения подвергаются стрессовому воздействию за счет резкой перемены условий их существования, поэтому в начале этого этапа чрезвычайно важно создать им наиболее комфортные условия на новом месте произрастания, и, кроме того, повысить их устойчивость к стрессам, используя различные регуляторы роста – адаптогены. Также следует постепенно снижать влажность воздуха и температуру, приближая их значения к условиям открытого грунта.

Для высадки в почвенные субстраты используют только те растения, которые в своем развитии достигли определенных параметров (длина корней не менее 2 см, надземная система состоит из 3-4 листьев и имеет общую высоту не менее 2 см).

На этапе адаптации растений к нестерильным условиям почвенный субстрат предварительно проливают 5%-ным перманганатом калия и оставляют в темном месте на 1 неделю. Для лесных ягодных растений (голубика полувысокая, княженика арктическая, жимолость съедобная) в качестве субстрата используют верховой или переходный торф. Торф смешивают с песком (3:1) и мульчируют сверху сфагнумом, являющимся хорошим антисептиком и влагоудержителем. Приготовленный субстрат раскладывают в кассеты или микропарники, в которые пересаживают растения *in vitro*. При этом должна поддерживаться температура воздуха +25°C, влажность – 80-90%.

Для успешной адаптации и получения 100% приживаемости целесообразно использовать туманообразующую установку (как правило, используется в производственных масштабах). Для небольших партий растений целесообразно применять микропарники или использовать индивидуальное закрытие растений полиэтиленовыми стаканчиками на 14-20 суток. По мере роста растений их пересаживают в более объемные емкости со свежим субстратом. Дальнейшее их выращивание проходит по принятой агротехнике для каждого вида растения.

При адаптации растений *in vitro* с хорошо развитой корневой системой к нестерильным условиям *ex vitro* необходимо с помощью пинцета вытащить их из пробирки и промыть корни 1%-ым раствором перманганата калия (слабо розовый цвет) во избежание развития впоследствии патогенной микрофлоры. Далее растения нужно пересадить в кассеты с суб-

стратом и полить водой. Затем растения следует опрыснуть водой из пульверизатора и надеть колпачки, после чего кассеты нужно поместить в условия освещения (8000 лк). Каждый день растения необходимо опрыскивать в течение 1 недели, после чего провести первую подкормку половинным минеральным составом среды MS. Через 10 суток следует провести первую ревизию растений.

Типы субстратов и условия, рекомендуемые для адаптации лесных ягодных растений *in vitro* к почвенным условиям *ex vitro*, приведены в табл. 2.

Таблица 2 Субстраты для адаптации микроклонов лесных ягодных растений к условиям *ex vitro*

Вид ягодной культуры	Субстрат	рН субстрата	Высота растения, см	Примерный период адаптации
Голубика полувысокая	Переходный торф	4,8-5,2	1,5-2,0	Февраль–апрель
Княженика арктическая	Переходный торф, кокосовый	5,5-5,8	2,0-3,0	март–июнь
Жимолость съедобная	Кокосовый	6,5-7,0	4,0	апрель–май

3. ВЫБОР И ПОДГОТОВКА УЧАСТКА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПЛАНТАЦИИ

Добыча торфа может осуществляться на болотах различных типов (верхового, переходного или низинного), поскольку все они имеют ряд общих особенностей. Для них характерны:

- обильное застойное или слабопроточное увлажнение верхних горизонтов почвогрунтов;
- специфическая болотная растительность с господством видов, приспособленных к условиям обильного увлажнения и недостатка кислорода;
- процесс накопления торфа и толщина отложившегося торфа такова, что живые корни основной массы растений не достигают минерального грунта.

Торфяное месторождение – это болото промышленного значения, которое по своим размерам и запасам торфа выделено как объект промышленного использования. Торфяное месторождение может быть в естественном или осушенном состоянии, а также находиться в стадии разработки

или после добычи торфа. Добыча торфа на торфяном болоте прекращается при сработке залежи до 0,5-0,7 м [5].

В зависимости от способа добычи выработанные торфяники представляют собой в той или иной степени (как правило, очень сильно) нарушенные участки, имеющие неровную поверхность. Только при добыче торфа фрезерным способом выработанные участки имеют более-менее ровную поверхность. Площадь таких выработанных торфяных месторождений в России к концу XX столетия насчитывала один млн. га.

В первые годы после выхода из-под торфоразработок площадь остается чистой от растительности. Процесс зарастания начинается в основном на 3-5-й год после окончания торфоразработок и происходит сначала медленно. Далее интенсивность зарастания возрастает и площади, вышедшие из-под торфодобычи, зарастают разнообразной растительностью, образуя различные растительные ассоциации. Участки с большим слоем торфа раньше и более интенсивно зарастают травянистой растительностью. Ход естественного возобновления улучшается с повышением торфистости торфа.

В то же время, выработанные торфяники пригодны для создания на них посадок различных видов лесных ягодных растений. Оптимальные для выращивания данных видов растений участки выработанных торфяников должны иметь следующие параметры:

- выработанные участки верховых или переходных болот должны иметь мощность остаточного слоя торфа не менее 50 см;
- наиболее подходящими для закладки посадок ягодников считаются только что вышедшие из-под торфоразработок площади (фрезерные поля), т.к. в большинстве случаев поверхность таких полей свободна от сорняков, хорошо спланирована и имеется осушительно-обводнительная сеть;
- участок должен быть хорошо дренирован из-за плохой переносимости лесными ягодными растениями застойного увлажнения;
- оптимальный уровень грунтовых вод на фрезерном участке – 60-80 см, при этом следует предусмотреть возможность их регулирования на лесном участке.

Первичная подготовка участка заключается в расчистке его от кустарников и травянистой растительности, а также в приведении в порядок имеющейся осушительной и дорожной сети, с тем, чтобы иметь доступ техники в любое место подобранного участка.

Подготовка почвы на выработанных торфяниках должна производиться с учетом мощности оставленного слоя торфа. Системой обработки

почвы предусматривается создание мелкокомковатой структуры в пахотном слое (0-30 см). При слое торфа 0,5 м и более производится вспашка с оборотом пласта на глубину 0,4 м и двукратное дискование (бороной БД-2,5). При меньшей мощности остаточного слоя торфа необходимо только дискование или рыхление, чтобы улучшить аэрацию почвы. Одновременно производится ручной подбор и вывозка выпаханных древесных остатков.

После рыхления почвы участок выравнивают бульдозерами, скреперами или другими специальными механизмами, вслед за выравниванием осуществляется планировка поля планировщиками разных марок или шнековым профилировщиком ТПШ-2. Высотные отметки поверхности поля, предназначенного для выращивания лесных ягодных растений, могут иметь уклон до 10 см на 100 м.

4. ПОСАДКА

4.1. Голубика полувысокая

В качестве посадочного материала используют 2-3-летние кусты голубики полувысокой высотой 0,5 м и несколько крепких побегов формирования с хорошо развитой корневой системой. Посадка растений на постоянное место проводится весной перед началом роста или осенью после его окончания. Голубику с закрытой корневой системой (в контейнерах) можно высаживать в течение всего вегетационного периода. Растения следует высаживать в лунки с хорошо разрыхленной почвой. Размер лунки определяется свободным размещением в ней корней саженца. Растения заглубляют в почву на 5-7 см глубже. Расстояние между кустами в ряду должно составлять 1,0-1,5 м. Кусты раннеспелых сортов рекомендуется размещать с большей густотой, позднеспелых – реже. Расстояние между рядами определяется параметрами машин и механизмов, применяемых для ухода за посадками. На участках с подготовленными посадочными ямами следует высаживать по одному кусту в центре гнезда.

4.2. Княженика арктическая

В качестве посадочного материала используются 2-летние сеянцы княженики арктической. Посадку рекомендуется производить рядами в апреле–мае. При этом расстояние между рядами должно составлять 1,0 м, между растениями в ряду – 0,3 м. В одно посадочное место высаживают по

2-3 побега высотой 7-10 см с частью корней. При посадке под растения следует вносить комплексное минеральное удобрение – азофоску из расчета по 20 кг/ га азота, фосфора и калия по действующему веществу.

4.3. Жимолость съедобная

В качестве посадочного материала лучше использовать сортовые растения жимолости съедобной полученные методом клонального микро-размножения. Посадку проводят 2-летними саженцами по схеме 3,0×1,5 м. Жимолость отзывчива на внесение удобрений. При высокой кислотности проводят известкование почвы, оптимальный уровень рН должен находиться в пределах 5,5-6,5. При посадке рекомендуется внесение 8-10 кг перегноя или компоста, а также 100-150 г двойного суперфосфата. Вносят удобрения осенью из-за высокой уязвимости растений к болезням при очень ранней вегетации в весенний период. Растения высаживают в посадочные ямы размером 40×40×40 см. При посадке саженцы заглубляют на 5-7 см, при этом, если корни сильно повреждены, то соответственно укорачивают надземную часть. Затем для обеспечения лучшей приживаемости проводят послепосадочный полив и мульчирование.

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Агафонов, Н. В.* Применение регуляторов роста в плодоводстве / Н. В. Агафонов, В. В. Фаустов. – М. : ВНИИТЭИСХ, 1972. – 64 с.
2. *Агафонова, Н. В.* Размножение растений / Н. В. Агафонов. – М. : Мир, 1987. – 192 с.
3. *Багаев, С. С.* Биологическая рекультивация выработанных торфяных месторождений в Костромской области / С. С. Багаев // Болотные экосистемы: фундаментальные аспекты охраны и рационального природопользования : сб. ст. Всеросс. науч.-практ. конф., посв. 100-летию со дня образования Гос. природного лесомелиоративного заказника респ. значения «Лебедань» (г. Йошкар-Ола, 25–28 сентября 2012 г.). – Йошкар-Ола, 2012. – С. 116–119.
4. *Бутенко, Р. Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко. – М. : ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
5. Выработанные торфяные месторождения, их характеристика и функционирование / Л. И. Инишева [и др.]. – Томск : Изд-во Томского гос. пед. ун-та, 2007. – 185 с.
6. *Гельцер, Г. В.* Поленика (*Rubus arcticus* L.) как полезное и красивое растение / Г. В. Гельцер // Вестник Российского общества садоводства. – 1860. – № 6. – С. 50–53.
7. *Жолобова, З. П.* Культура синей жимолости в Сибири / З. П. Жолобова // Состояние и перспективы развития редких садовых культур в СССР : сб. науч. тр. – Мичуринск : ВНИИ садоводства им. И. В. Мичурина, 1989. – С. 29–33.
8. *Куклина, А. Г.* Возможности размножения перспективных сортов жимолости синей / А. Г. Куклина, Е. А. Семерикова // Актуальные проблемы садоводства России и пути их решения. – 2007. – С. 163–164.
9. *Лукиша, В. В.* Жимолость. / В. В. Лукиша. – М. : Лесная пром-сть, 1990. – 64 с. – (Декоративные кустарники).
10. Помология : в 5 т. Т. V: Земляника. Малина. Орехоплодные и редкие культуры / Под общ. ред. Е. Н. Седова, Л. А. Грюнер. – Орел: ВНИИСПК, 2014. – 592 с.
11. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха [и др.]. – М. : Высш. школа, 2008. – 710 с.
12. *Скворцов, А. К.* Голубые жимолости: ботаническое изучение и перспективы культуры в средней полосе России / А. К. Скворцов, А. Г. Куклина. – М. : Наука, 2002. – 160 с.
13. *Тяк, Г. В.* Биологическая рекультивация выработанных торфяников путем создания посадок лесных ягодных растений / Г. В. Тяк, Л. Е. Курлович, А. В. Тяк // Вестник Казанского гос. аграрного ун-та. – 2016. – Т. 11. – № 2. – С. 43–46.
14. *Тяк, Г. В.* Перспективы культивирования и селекции лесных ягодных растений в Костромской области / Г. В. Тяк, Л. Е. Курлович, Г. Ю. Макеева, А. В. Тяк // Природа Костромского края : современное состояние и экомониторинг : мат. регион. науч.-практич. конф. (г. Кострома, 24–25 марта 2017 г.). – Кострома, 2017. – С. 146–151.
15. *Фрейдлинг, М. В.* Поленика (*Rubus arcticus* L.) / М. В. Фрейдлинг // Известия Кар.-Финск. филиала АН СССР. – 1949. – № 3. – С. 49–57.
16. *Чернова, Е. П.* Поляника (*Rubus arcticus* L.) и ее введение в культуру / Е. П. Чернова. – М.-Л. : Изд-во АН СССР, 1959. – 35 с.
17. Blueberry Nursery Stock. Commercial Growers Catalog & Price List. – Oregon, USA : Fall Creek Farm & Nursery Inc., 2000. – 20 p.
18. *Paal T.* 2000. Cultivation of *Vaccinium angustifolium* from Seed. Problems of Rational Utilization and Reproduction of Berry Plants in Boreal Forests on the Eve of the XXI Century. Proceedings of the Interational Conference, Glubokoye-Gomel, Belarus, 11–15 September 2000. – P. 193–196.
19. *Ragnar M., Rytkonen P., Hedh J.* 2017. Åkerbär. Black Island Books. – 169 p.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫРАЩИВАНИЮ
ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ЛЕСНЫХ ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР
IN VITRO И *IN VIVO***

С. С. Макаров, С. А. Родин, А. И. Чудецкий

В авторской редакции

Компьютерная верстка, оформление обложки *Л.М. Харина*
Фото *С.С. Макаров, А.И. Чудецкий*

Формат 60 × 90 1/16
Объем 1.5 печ.л.
Тираж 300 экз.

Отпечатано в ФБУ ВНИИЛМ
141200, г. Пушкино Московской обл., ул. Институтская, 15