

УДК 634.11: 581.143.6

*В.Е. Джафарова, к.с.-х.н.*

*Л.В. Ташматова, к.с.-х.н.*

ГНУ Всероссийский НИИ селекции плодовых культур, Орёл, Россия, info@vniispk.ru

## **КАЛУСО- И МОРФОГЕННАЯ СПОСОБНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЫЛЬНИКОВ, ИММУННЫХ К ПАРШЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ**

### **Аннотация**

Изложены результаты культивирования изолированных пыльников иммунных к парше сортов яблони. Интенсивность каллусогенеза определялась генотипом исходного сорта. Наибольшая частота каллусообразования была характерна для сортов на среде Хеллера. Образовавшиеся каллусы морфогенные, с плотной консистенцией и бугристой поверхностью. Цвет варьировал от белого до желтого.

Приведены особенности формирования каллуса с использованием пиклорама и возможности морфогенеза. Выявлена ауксиновая активность пиклорама как в темноте, так и на свету. Определена оптимальная концентрация пиклорама для каллусогенеза (4 мг/л среды), обеспечивающая формирование морфогенного каллуса как в темноте, так и на свету. Индуцированы корни у сортов Юбилей Москвы, Афродита и Свежесть, а также почки у сорта Орловское полесье.

Показана каллусообразовательная способность сортов в зависимости от очередности распускания цветков.

**Ключевые слова:** пыльники, каллусогенез, морфогенез, цветки, пиклорам.

*V.Y. Dzhafarova, candidate of agricultural sciences*

*L.V. Tashmatova, candidate of agricultural sciences*

SSI All Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding of RAAS, Orel, Russia, info@vniispk.ru

## **ASSESSMENT OF PEAR VARIETY COLLECTION OF МАКОР OS VIR FOR WINTER HARDINESS**

### **Abstract**

The results of culting apple anthers in immune to scab varieties. The intensity of callusogenesis was determined by the genotype of the initial variety. The greatest callus formation was characteristic for the varieties in B<sub>5</sub> medium. The formed calluses were morphogenic ones, with dense consistence and knobby surface. The color varied from white to yellowish.

The peculiarities of callus formation using picloram are shown. Auxin activity of this preparation has been revealed as in the darkness so in the light. The optimal concentration of picloram (4mg/l of the medium) was determined for apple callusogenesis. That concentration provided the formation of the morphogenic callus both in the darkness and in the light. The roots in cv. Yubiley Moskvyy, Afrodita and Svezhest and the buds in cv. Orlovskoye polesie were induced.

Callus formation ability of apple varieties depending on the sequence of floescence is shown.

**Key words:** anthers, callusogenesis, morphogenesis, blossoms, picloram.

Развитие метода «андрогенеза», то есть культивирование *in vitro* пыльников, связано с получением гаплоидных растений из пыльцы в культуре *in vitro*. Открытие явления гаплоидии и получение первого гаплоидного растения *Datura stramonium* датировано 1922 годом [1]. К середине 30-х годов прошлого столетия были получены и изучены десятки гаплоидов у многих видов растений. Тогда же и были высказаны идеи о получении из гаплоидов абсолютно гомозиготных диплоидных линий и использовании их в селекции [2, 3].

Культивирование изолированных пыльников основано на развитии тысяч микроспор, каждая из которых может дать гаплоидное растение. Применение гаплоидных растений в селекции позволяет сегодня решать следующие проблемы: создавать константные нерасщепляющиеся гомозиготные формы в первой генерации, и, таким образом, сокращать селекционный процесс на 3...4 генерации, необходимые для обычной схемы селекции; упрощать мутационную селекцию, поскольку у гаплоидов отсутствует доминирование и все гены имеют фенотипическое проявление [4]; получать каллусную ткань, содержащую не только гаплоидные клетки, но и клетки других уровней пloidности, что может быть дополнительным источником для селекции [5].

Использование техники культивирования пыльников позволило создать целый ряд сортов риса и пшеницы [6, 7], табака, ячменя и других культур. У многих плодовых культур удалось так же получить андрогенные растения: у земляники, яблони, цитрусовых [8].

Развитие пыльцевого каллуса многолетних плодовых культур, преимущественно, идет по пути косвенного андрогенеза. Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную, является присутствие в питательной среде представителей двух групп фитогормонов: ауксинов и цитокининов [9]. Мощным индуктором морфогенеза в каллусной ткани также является наличие в среде цитокининов и ауксинов, а также их соотношение. Для этапа морфогенеза используются традиционные ауксины: 2,4-Д, НУК, ИУК.

Наилучшая результативность процесса андрогенеза пока принадлежит однолетним культурам. Получение гаплоидных растений из изолированных пыльников для многолетних плодовых культур достаточно нестабильно и малорезультативно.

В 1963 году the Dow Chemical Company индуцировала 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновую кислоту (торговое название тордон, химическое название – пиклорам) как гербицид для борьбы с сорной растительностью. Действие этой кислоты на клетки наступает уже через 30 минут, которое проявляется в изменении состояния ядра, затем цитоплазмы и оболочки. Данное вещество эффективно не только как гербицид, но еще и обладает высокой ауксиновой активностью [10]. Основной функцией ауксина в культуре тканей и клеток растений является его участие в регуляции размножения клеток. Этим и обусловлено его обязательное включение в питательные среды для культуры тканей и использование как важнейшего средства управления ростом и морфогенезом в изолированной культуре. Действие 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновой кислоты, так же, как и ауксинов, сопровождается усилением накопления белка и нуклеиновых кислот [11].

Применение пиклорама в условиях *in vitro* для получения каллусов у однолетних культур показало его более высокую стимулирующую активность по сравнению с 2,4-Д, ИУК и НУК [12, 13, 14]. Данный препарат проявил высокую активность в индукции образования каллуса и его размножении у лука [15]. Каллус, полученный с помощью пиклорама, дает лучший органогенез при посадке на органообразующую среду [12] и по сравнению с 2,4-Д имеет более низкую фитотоксичность [16, 17]. При выращивании каллусов на свету, пиклорам, в отличие от 2,4-Д, не ингибирует синтез хлорофилла, и поэтому более пригоден для получения органогенных каллусов [18].

Возможности индукции каллусогенеза и морфогенеза у яблони по сравнению с однолетними культурами ограничены, и результативность еще мала: морфогенетические процессы индуцируются редко и характеризуются нестабильностью. Из отдельных ценных генотипов вообще не удастся получать растения-регенеранты из пыльцевого каллуса [19], поскольку каллусная ткань, возникшая из пыльников, не всегда способна к морфогенезу.

Учитывая низкий выход гаплоидов при культивировании пыльников многолетних плодовых растений, с одной стороны, и преобладающую ауксиновую активность препарата пиклорам на однолетних культурах в сравнении с традиционно используемыми (2,4-Д, НУК, ИУК) – с другой стороны, необходимо было изучить возможности каллусо- и морфогенеза яблони с использованием пиклорама. К тому же,

данные по его применению в индукции каллуса и органогенеза у плодовых культур отсутствуют.

Успешное использование культивирования *in vitro* пыльников и получение андрогенных гаплоидов по однолетним и многолетним культурам послужили причиной для подобных исследований с 2005 года в ГНУ ВНИИСПК.

### Материал и методы исследований

В качестве исследуемых объектов использовали сорта яблони Орловское полесье, Афродита, Свежесть, Юбилей Москвы – носители гена  $V_f$  (иммунитета к парше).

Бутоны для посева пыльников отбирали в сухую погоду по внешним признакам, считающимся для яблони наиболее продуктивными в отношении каллусообразования (бутоны выдвинуты, но плотно сомкнуты, без белого конуса, пыльники которых имеют зеленовато-желтый цвет). Бутоны помещали в чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой и ставили в холодильник на 3 дня при температуре +3, +4°C.

Посев пыльников проводили на среде Мурасиге-Скуга и Хеллера для выявления лучшего каллусообразования. Работа по посеву пыльников проводилась в асептических условиях из расчета 1 бутон на пробирку. Посеянные пыльники изначально культивировали в условиях термостата при температуре 25°C и в культуральной – в условиях 16-часового фотопериода с интенсивностью освещения до 1000 люкс и влажностью воздуха 60...70%.

Среды, используемые для индукции каллусообразования и морфогенеза, содержали макро и микросоли, обязательные компоненты: витамины  $B_1$ ,  $B_6$ , РР по 0,5мг/л; гидролизат казеина 600...800 мг/л; мезоинозит – 100 мг/л; сахарозу – 20 г/л; агар – концентрация которого варьировала в зависимости от его вида. В среды были включены стимуляторы роста: ауксины, цитокинины, гиббереллин. В группу используемых ауксинов вошли НУК, ИУК, 2,4-Д, пиклорам; в группу цитокининов – кинетин и 6БАП.

Для оценки ауксиновой активности пиклорама в процессе каллусогенеза за основу брали рекомендованный второй вариант среды МС для яблони [5]. Соотношение ауксин: цитокинин в индукции каллусообразования базового варианта среды равнялось 1:1. Концентрацию пиклорама подбирали эмпирически.

### Результаты исследований

Частота каллусообразования пыльников сортов яблони различалась по годам: наибольшей она была в 2006 году и находилась в пределах

57,0...93,1% при формировании каллуса в темноте. На свету данный показатель варьировал от 12,5 до 63,4%. Наименьшее каллусообразование по сортам было в 2007 году и составляло от 26,9 до 71,4% в темноте, на свету 13,0...31,7% (табл. 1).

Таблица 1 – Эффективность каллусообразования пыльников яблони в культуре *in vitro*, 2007г.

Сорт	Питательная среда	Количество эксплантированных пыльников	Частота каллусообразования, %
<b>В темноте</b>			
Афродита	МС	373	46,9±1,3
	Хеллера	364	65,9±0,9
Свежесть	МС	296	56,4±1,5
	Хеллера	353	71,4±1,2
Орловское полесье	МС	379	38,4±0,9
	Хеллера	363	67,3±1,2
	МС(П <sub>4</sub> )*	341	26,9 ±1,1
Юбилей Москвы	МС	391	49,4±1,3
	Хеллера	404	72,5±0,4
	МС(П <sub>4</sub> )	391	31,0±1,0
<b>На свету</b>			
Орловское полесье	МС	360	25,8±0,9
	МС(П <sub>4</sub> )	249	18,9±0,7
Юбилей Москвы	МС	388	31,7±1,1
	МС(П <sub>4</sub> )	422	13,0±0,8

Примечание: МС(П<sub>4</sub>)\* – среда Мурасиге-Скуга с добавлением 4 мг/л пиклорама

Интенсивность каллусообразования определялась генотипом исходного растения. Наибольшая частота каллусообразования была характерна для сортов Свежесть (72,5%) и Юбилей Москвы (90,6%). Если сравнить влияние состава сред, то минеральная основа питательной среды Хеллера оказалась для сортов более показательной. Пыльники всех сортов на данной среде были более продуктивными в отношении каллусообразования и до стимуляции морфогенетических процессов, каллусная ткань была более развитой. Образовавшиеся каллусные ткани (косвенный андрогенез) различались плотностью и цветом. В основном это были морфогенные каллусы плотной консистенции с бугристой поверхностью. Цвет его варьировал от белого до желтоватого. В единичных случаях встречались каллусы рыхлые, водянистые, молочно-белого цвета.

Вышеизложенные особенности каллусообразовательной способности относятся к пыльникам, выделенным из смешанных цветков соцветия. По данным U. Hund, R. Stosser [20], центральный (средний) цветок всегда имеет морфологическое и физиологическое доминирование, которое проявляется в усиленной конкуренции с боковыми цветками. Это обстоятельство послужило началом для проверки рабочей гипотезы на изучение интенсивности каллусогенеза и индуцирования морфогенеза: пыльники, из отдельных по очередности распускания цветков будут иметь лучшие показатели каллусогенеза и морфогенеза.

Исследования вариантов каллусогенеза сортов Свежесть и Афродита по очередности распускания цветков (центральный, второй, третий) показали, что у сорта Свежесть с соблюдением очередности цветков каллусогенез увеличивается от центрального к третьему цветку (63,5% → 66,5% → 73,5%), а в варианте из смешанных цветков показатель каллусогенеза был равен всего лишь 46,1%. По степени каллусообразования сорт Афродита проявил ту же закономерность (33,3% → 43,7% → 47,6%). Степень каллусообразования этого сорта из пыльников смешанных цветков равнялась 40,0%.

Для оценки действия пиклорама на этапе каллусогенеза использовали три уровня концентрации. Было установлено, что за годы исследований пиклорам проявил значительную ауксиновую активность в индукции каллусообразования. Эффективность каллусогенеза исследуемых сортов варьировала от 26,0 до 83,3% в зависимости от концентрации пиклорама в темноте и от 11,3 до 74,9% в условиях пониженного освещения. При этом оптимальным уровнем концентрации пиклорама считаем 4 мг/л, поскольку, за все годы исследований (и те, которые не представлены в таблице) именно такая концентрация давала наилучшие показатели каллусогенеза обоих сортов яблони, как в темноте, так и на свету (табл. 2).

Каллус, сформированный в темноте на среде с пиклорамом, бугорчатый, плотный, белого или молочного цвета. При перенесении каллуса на свет половина его поверхности зеленеет в 99 из 100 случаев, тогда как без пиклорама – от 32% до 51%, в зависимости от сорта.

Каллус, сформированный на свету, имел интенсивную зеленую или зеленовато-белую окраску, более плотный, чем сформированный в темноте, с четко очерченными меристематическими очагами.

Каллус, образовавшийся в темноте без пиклорама, при его дальнейшем пассировании приобретал водянистую структуру или рано старел, что характерно для всех сортов, хотя и в разной степени. Таких негативных особенностей в каллусах на среде с пиклорамом не отмечалось. Морфологические признаки каллусов, полученных на среде с пиклорамом, стабильны из года в год.

Таблица 2 – Эффективность каллусогенеза у пыльников яблони в присутствии пиклорама, %

Сорт	Питательная среда	Условия культивирования	
		Термостат	Светокомната
2005г.			
Орловское полесье	МС	56,3±1,5	43,1±1,0
	МСП <sub>2</sub> *	50,2±1,5	14,5±0,7
	МСП <sub>4</sub> **	39,8±0,9	22,6±1,0
Юбилей Москвы	МС	45,1±1,0	38,3±1,1
	МСП <sub>2</sub>	26,6±1,1	11,3±0,5
	МСП <sub>4</sub>	39,1±1,0	21,3±0,9
2006г.			
Орловское полесье	МС	69,2±1,2	56,1±1,1
	МСП <sub>2</sub>	57,0±1,3	12,9±0,7
	МСП <sub>4</sub>	82,0±0,5	58,1±0,7
Юбилей Москвы	МС	80,3 1,0	47,2 1,3
	МСП <sub>2</sub>	39,7±0,9	12,5±0,8
	МСП <sub>4</sub>	83,3±0,4	74,9±0,5
2007г.			
Орловское полесье	МС	38,4±0,9	25,8±0,9
	МСП <sub>4</sub>	26,9±1,1	18,9±0,7
	МСП <sub>6</sub> ***	40,0±1,0	20,3±0,8
Юбилей Москвы	МС	49,4±1,3	31,7±1,1
	МСП <sub>4</sub>	31,0±1,0	13,0±0,8
	МСП <sub>6</sub>	26,0±0,9	14,5±0,7

Примечание: \*, \*\*, \*\*\* – среда Мурациге-Скуга с добавлением соответственно 2 мг/л, 4 мг/л, 6 мг/л пиклорама.

Способность каллусных клеток к морфогенезу определяется соотношением цитокининов и ауксинов, входящих в состав питательных сред. При использовании пиклорама в качестве ауксина, были получены корни у сорта Юбилей Москвы при соотношении ауксин: цитокинин 1:2 (пиклорам : БАП). В каллусной массе сорта Свежесть индуцированы корни, но при увеличении концентрации ауксина: цитокининов 3:9 (пиклорам : БАП, кинетин) корни формировались внутри каллусной ткани. Изменение соотношения концентрации ауксин: цитокинин 1:20 положительно сказалось на морфогенной способности пыльцевого каллуса сорта Орловское полесье. У данного сорта отмечено образование 4-х почек. В каллусе сорта Свежесть и Афродита при использовании традиционного ауксина (НУК) и цитокининов (БАП и кинетин) в соотношении 1:3 индуцированы корни.

В каллусной массе в зависимости от порядка распускания цветков морфологические процессы не индуцированы.

Результаты исследований показали, что развитие пыльников исследуемых иммунных к парше сортов яблони проходило по пути косвенного андрогенеза. Интенсивность каллусогенеза определялась генотипом исходного сорта, искусственной питательной средой и экзогенными стимуляторами роста. Использование препарата под названием пиклорам показало его значительную ауксиновую активность в процессе каллусообразования яблони из пыльников, как на свету, так и в темноте. Порядок распускания цветков, в определенной степени, определяет интенсивность каллусообразовательного процесса. Способность каллусных клеток сортов яблони с геном  $V_f$  к морфогенезу определяется по каждому сорту своим соотношением ауксин : цитокинин.

### Литература

1. Blakeslee A.F. A haploid mutant in *Datura stramonium* / A.F. Blakeslee, J. Belling, M.E. Farnham, A.D. Berger // *Science*. 1922. – V. 55. – P. 646-647.
2. Карпеченко, Г. Д. Теоретические основы селекции растений / Г. Д. Карпеченко. – М. – Л.: Сельхозгиз, 1935. – Т.1. – 435 с.
3. Навашин М.С. Новая возможность в селекции (об использовании гаплоидов) / М.С. Навашин // *Ботанический журнал*. 1934. – Т. 19, № 4. – С. 640-641.
4. Гапоненко, А. К. Перспективы использования культуры клеток растений в селекции / А. К. Гапоненко // *Успехи современной генетики*. – М.: Наука, 1987. – В. 14. – С. 64-74.
5. Жуков, О. С. Методические рекомендации по получению растений – регенерантов плодовых пород в культуре пыльников / О. С. Жуков, О. Я. Олейникова, Н. И. Савельев. – Мичуринск, 1994.- 36 с.
6. Hu Han, Crop improvement by anther culture in genetics : New frontiers / Hu Han // *Proc. XV Intern. Congr. Genet. New Delhi*. – 1984. – P. 77-85.
7. Тырнов, В. С. Использование гаплоидов в генетических исследованиях / В. С. Тырнов // *Гаплоидия и селекция*. – М.: Наука, 1976. – С. 140-151.
8. Dayuan Wang, Tissue Culture of Fruit Crops in China / Wang Dayuan, Gui Yao-lin, Sun jiang-Sun // *Hortscience*. – 1988. – V. 23. – №6. – P. 962-965.
9. Шевелуха, В. С. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев. – М.: Высш. шк., 1998. – 416с.
10. Kefford, N. P. A potent auxin with unigue chemical structure – 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic / N. P. Kefford, O. N. Caso // *Bot. Gaz.* – Vol. 127. – №2/3. – С. 159-163.



11. Гамбург, К. З. Ауксины в культурах тканей и клеток растений / К. З. Гамбург, Н. И. Рекославская, С. Г. Швецов. – Новосибирск: Наука, 1990. – 243 с.

12. Dulieu, H. Quelques effets de l'acide 4-amino-3,5,6-trichloropicolinique (piclorame) sur les tissue de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. s. en. Culture in vitro // H. Dulieu, J. – C. G. Martin // C. R. Acad. Sci. – 1972. – Vol. D. 274. – №18. – P. 2574-2577.

13. Мусияка, В. К. Активизация деления и растяжения клеток культуры ткани табака в присутствии 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновой кислоты / В. К. Мусияка, Ф. Л. Калинин // Физиология и биохимия культурных растений. – 1975. – Т. 7. – №5. – С. 486-492.

14. Vian, W. E. The effectiveness of picloram as an auxin source compared to 2,4-D in wheat callus culture medium / W. E. Vian // Abstr. – 1976. – P. 65.

15. Phillips, G. C. Effects of picloram and other auxins on onion tissue cultures / G. C. Phillips // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1983. – Vol. 108. – №6. – P. 948-953.

16. Чернова, Л. К. Сравнение дифференцирующего воздействия 2,4-Д и 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновой кислоты на ткани бобовых и злаковых растений / Л. К. Чернова, М. Н. Прохоров, Б. В. Филин-Колдаков // Физиология растений. – 1975. – Т. 22. – №2. – С. 170-175.

17. Mok, M. G. Genotypic responses to auxins in tissue cultures of *Phaseolus* / M. G. Mok, D. W. Mok // *Physiol. Plant.* – 1977. – V. 40. – №4. – P. 261-264.

18. Collins, G. B. Use of 4-amino-3,5,6-trihlorpicolinic an auxin source in plant tissue cultures / G. B. Collins, W. E. Vian, G. C. Phillips // *Crop Sci.* – 1978. – V. 18. – №2. – P. 286-288.

19. Хохлов В. С. Гаплоидия и селекция / В. С. Хохлов. – М.: Наука, 1976. – 221 с.

20. Hund, U Einflu der Blütenstellung innerhalb der infloreszenz auf das Pollen – schauhwachstum und die Fruchtentwicklung beim. Apfel. / U. Hund, R. Stosser // «Mitt Klosterneuburg», 1984. – Т. 34. – №6. – С. 261-268.