



УДК 634.11:581.16:576.356.5

В. Е. Джафарова, к.с.-х.н.

ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, Россия, Орел, info@vniispk.ru

ОЦЕНКА МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ И ИНДУЦИРОВАНИЯ ПОЛИПЛОИДНЫХ МЕРИСТЕМ И ФОРМ ЯБЛОНИ (*MALUS DOMESTICA* BORKH)

Аннотация

В статье обобщаются особенности этапа введения меристем сортов яблони, иммунных к парше. Оптимизация процессов регенерации из эксплантов и собственно микроразмножения за счет подбора питательных сред позволяет тиражировать сорта в виде почек и побегов. Применение среды И.М. Фардзиновой (Ф) способствовало в основном нарастанию большего количества почек в сравнении с побегами. Адвентивные и апикальные почки – наилучший вариант исходного материала для колхицинирования. Для получения полноценных колхицинированных растений нами разработана схема поэтапно.

Индукцированы полиплоидные меристемы ($2n=51$ и $2n=68$), а также полиплоидная форма яблони ($2n=68$) из проростков с использованием колхицина.

Ключевые слова: яблоня, микроразмножение, полиплоидия, меристема, колхицин

UDC 634.11:581.16:576.356.5

V. E. Dzhafarova, candidate of agricultural sciences

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

ESTIMATION OF PROPAGATION AND INDUCING OF POLYPLOIDY MERISTEM AND SELECTIONS OF *MALUS DOMESTICA* BORKH

Abstract

This publication generalizes the features of the null stage of meristem planting of apple cultivars immune to scab. The optimization of regeneration processes from explants and micropropagation proper for account of nutrient medium selection gives an opportunity to augment cultivars in condition of buds and shoots. The use of F-medium (Fardzinova-medium) basically favoured growth of a great number of buds compared to shoots. Adventive and apical buds are the best variants of the initial material for colchicine treatment. For the purpose of obtaining valuable colchicized plants the scheme has been worked out stage-by-stage.

Polyploidy meristem ($2n=51$ and $2n=68$) as well as apple polyploid ($2n=68$) have been induced from seedlings in the stage of a cotyledon with the use of colchicine.

Key words: apple, micropropagation, polyploidy, meristem, colchicine

Введение

В современном садоводстве большинство культивируемых сортов яблони диплоиды ($2n=34$). Однако практический и коммерческий интерес представляют также триплоиды ($2n=51$). Данный факт обусловлен их биологическими и хозяйственными особенностями. Триплоидные сорта отличаются высокой и регулярной урожайностью по годам [6, 15], большей самоплодностью [18], отсутствием резко выраженной периодичности плодоношения [2], высокой устойчивостью к болезням [9], длительным сроком хранения [12]. Плоды триплоидов по массе [2, 7] и содержанию витамина С [2, 6] превосходят диплоидные.

Триплоидия у яблони, как замечает Г.А. Бавтуто [1], самый низкий уровень полиплоидии, который дает наивысший эффект. В настоящем триплоидные сорта представлены такими, как Пепин Ньютона, Ренет Кулона, Болдуин, Витязь, Низкорослое, Мутсу, Память Семакину, Рождественское, Юбиляр, Августа, Яблочный Спас и многими другими известными сортами.

Тетраплоидные формы ($2n=68$), как правило, не являются хозяйственно ценными, но как исходный материал в селекции яблони на полиплоидном уровне, они вызывают значительный интерес. Наиболее эффективным способом массового получения триплоидов служат гетероплоидные скрещивания типа $2x \times 4x$ и $4x \times 2x$ [10, 11].

Тетраплоидные формы могут быть выявлены не только спонтанным путем или получены в виде спортов известных сортов в результате гибридизации, но и путем химического воздействия на растения. Наиболее эффективным полиплоидизатором растительных тканей в настоящее время признан алкалоид колхицин. Ранее проведенные исследования по воздействию колхицином в разных концентрациях на сухие и наклюнувшиеся семена и проростки на разных фазах развития, а также точки роста взрослых растений указывают на возможность получения полиплоидных растений [4, 5].

Изучая индуцирование полиплоидов *in vitro* у плодовых культур, ряд авторов [8, 14, 17] отмечает, что воздействие химическими агентами (полиплоидизирующими веществами) необходимо осуществлять в момент деления наибольшего количества клеток. Для этих целей используется меристема, количественный показатель которой обеспечивается с помощью микроразмножения *in vitro*.

Полиплоидия, как метод селекции яблони, на сегодня используется практически лишь в единичных научно-исследовательских учреждениях. В ФГБНУ ВНИИСПК ведется планомерная крупномасштабная селекционная работа по яблоне. Здесь в свое время была создана самая большая коллекция полиплоидных форм – доноров диплоидных гамет. Недостатком этой коллекции является отсутствие среди них форм, иммунных к парше. Имея иммунные доноры диплоидных гамет можно надеяться на получение иммунных триплоидных сортов с двойным геномом устойчивости [13]. В связи с этим существует необходимость увеличения количества гомогенных тетраплоидных форм и диплоидно-тетраплоидных химер. Важно при этом, чтобы второй гистогенный слой апикальных меристем точек роста химер яблони (подэпидермальный слой), отвечающий за формирование генетической ткани, был тетраплоидным ($4x$). При скрещивании такой химеры с диплоидными сортами можно получить триплоиды.

Необходимость индуцирования тетраплоидных форм от диплоидных иммунных сортов, а также диплоидно-тетраплоидных химер I типа послужила основанием для проведения исследований в этом направлении.

Методика исследований

На начальном этапе в исследования по микроразмножению были включены четыре сорта яблони: Болотовское, Имрус, Солнышко, Памяти Хитрово (носители гена V_f).

Этапы введения в культуру и собственно-микроразмножения проводили с учетом рекомендаций Ф.Л. Калинина, В.В. Сарнацкой и В.Е. Полищук [3].

Для регенерации из эксплантов и размножения яблони использовали среды Мурасиге - Скуга (МС) и Фардзиновой И.М. (Ф).

Для индукции диплоидно-тетраплоидных химер использовали семена яблони от свободного опыления.

Результаты исследований

Введение меристем яблони в культуру с использованием целого набора стерилизующих агентов: смесь 3%-й перекиси водорода и 96%-ного спирта (1:1) с последующей обработкой сулемой (0,1%); мертиолят (0,01 и 0,1%), смесь коммерческого препарата «Белизна» с водой (1:4) – показало, что наилучшим вариантом для стерилизации исходного материала среди испытанных был 0,1% раствор мертиолята с добавлением капли твин – 20 в течение 10 минут. При этом из всего разнообразия типов исходного материала лучше приживаются микропобеги, простые и этиолированные, высотой 5 – 7 мм.

Негативное действие фенольных соединений после введения эксплантов в культуру снимали пересадкой их на свежую питательную среду через 5...24 часа с момента введения.

Ненормальное разрастание и сильное обводнение тканей (витрификацию) из-за полного содержания в среде азотсодержащих солей исключали за счет уменьшения солей в первом и втором пассажах в 4 раза, а в третьем – в 2 раза.

Для массового размножения яблони с целью тиражирования меристем испытывали 6-БАП в концентрации 1,2 и 3 мг/л. При концентрации цитокинина 1 мг/л коэффициент размножения был всего лишь 1,4...1,7 в зависимости от сорта. При использовании БАП 2 и 3 мг/л этот показатель существенно не различался, составляя у сорта Болотовское 2,7, Имрус – 2,2, Памяти Хитрово и Солнышко – по 2,0.

Данные по двум этапам микроразмножения позволяют говорить всего лишь о способности иммунных сортов яблони к размножению в условиях *in vitro*, поскольку вышеуказанные показатели не могут обеспечить массовый выход меристем для колхичинирования.

При изучении практического опыта культивирования *in vitro* многолетних плодовых культур, было замечено, что И.М. Фардзинова [16], исследуя развитие меристем боковых почек груши сорта Кюре на предлагаемом ею варианте среды МС, получила конгломераты побегов, состоящие из 40...45 единиц.

В своих исследованиях мы решили испытать подобную среду в 2-х вариациях с добавлением 6-БАП в концентрациях 1 и 2 мг/л на яблоне сорта Болотовское. В итоге, коэффициент размножения сорта в среднем увеличился от 1,8 (среда МС + 1 мг/л 6-БАП) до 5,3 (среда Ф при наименьшем крайнем значении компонентов + 2 мг/л 6-БАП). На II этапе микроразмножения происходила в основном пролиферация почек. Если следовать вышеуказанным средам, то соотношение почек и побегов по первой среде составило 1,0:0,8, а по второй – 4,4:0,9. При этом максимальное значение суммы почек и побегов в конгломерате увеличилось от 4 до 15 единиц.

Если раньше, при коэффициенте размножения 2,7 сорта Болотовское в конгломерате преобладали побеги и из 40 пробирок (\varnothing 16 мм) можно было отобрать до 80 меристем, то размножение на среде Ф позволяет иметь множество почек для

колхицинирования.

Практический подбор почек для обработки колхицином показал, что целесообразнее использовать для этих целей адвентивные, размером 3...4 и апикальные – до 5 мм.

Колхицином обрабатывали почки сортов Болотовское и Имрус, выросшие *in vitro*, капельным способом (концентрация колхицина 0,05%; 0,1% и 0,2%; временная экспозиция 24, 48 и 72 часа), а также пассированные на среду, содержащую колхицин в концентрациях 0,01%; 0,02%; 0,03%; 0,04% и 0,05% при той же временной экспозиции. Пересаживая почки сразу после колхицинирования на среду МС, содержащую БАП в концентрации 2 мг/л, было отмечено замедленное их развитие до конгломератов. За четыре пассажа максимальная высота единичных побегов не превышала 10 мм. По такой схеме процесс получения растений довольно длительный.

Для равномерного поступательного и ускоренного роста колхицинированного материала и получения полноценных растений нами разработана схема поэтапно:

- 1- колхицинирование меристем;
- 2- пересадка меристем на среду МС с добавлением 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л;
- 3- пересадка конгломератов через 4 недели на среду МС с добавлением 6-БАП в концентрации 1 мг/л;
- 4- пересадка конгломератов через 4 недели на среду МС с добавлением 6-БАП в концентрации 0,1 мг/л;
- 5- пересадка оптимальных по высоте побегов (от 2 см) на среду $\frac{1}{2}$ МС, содержащую стимулятор ризогенеза;
- 6- адаптация растений к нестерильным условиям.

Конгломераты, не имеющие оптимальные по высоте побеги для этапа ризогенеза, вновь следует высаживать на среду согласно этапу №4.

Цитологический анализ колхицинированного материала, проведенный сотрудниками лаборатории цитоэмбриологии ФГБНУ ВНИИСПК, выявил изменения ploидности обработанных меристем.

При капельном способе обработки точек роста сорта Болотовское колхицином в концентрации 0,2% в режиме 72 часов и Имрус при той же концентрации алкалоида, но в режиме 24 часов, отмечены меристемы с триплоидным набором хромосом. С тетраплоидным набором хромосом получены меристемы сорта Болотовское, обработанные 0,1% раствором колхицина и выдержанные 48 часов, а также меристемы сорта Имрус при временной экспозиции 72 часа и концентрации колхицина 0,2%.

Добавление колхицина в среду вызвало изменение ploидности точек роста у сорта Имрус при концентрации колхицина 0,01% и экспозиции в 24 часа. Причем в этом варианте получены и тетраплоидные, и триплоидные меристемы, но последних больше (67%).

У сорта Болотовское при этой же концентрации колхицина, но временной экспозиции 48 часов отмечено наличие химерных тканей. Неравнозначное изменение ploидности меристемных тканей яблони, вероятно, связано с разной их чувствительностью к полиплоидизирующему агенту и диффундированием колхицина в делящиеся клетки или же степенью интенсивности клеточного деления в период воздействия колхицином.

Индукция полиплоидных форм яблони было предпринято в рекогносцировочном опыте обработкой проростков (семена от свободного опыления) 0,5% водным раствором колхицина. Данная концентрация рекомендовалась В.Н. Лизневым в 1975 году для искусственного получения полиплоидов.

В наших исследованиях эта концентрация оказалась губительной для проростков. Из 300 обработанных проростков возшло всего лишь 9. В открытом грунте прижилось только 5 растений (таблица 1).

Цитологический анализ растений открытого грунта (из проростков) показал, что одно растение тетраплоид. Это растение получено из семян от свободного опыления сорта Кандиль орловский. Проростки сорта были обработаны 0,5% раствором колхицина в течение 24 часов при температуре 20°C.

Таблица 1 – Эффективность обработки семян яблони 0,5% водным раствором колхицина

Сорт	Вариант обработки	Количество, шт.				
		Обработанных проростков	Посеянных проростков	Взошедших проростков	Растений	
					Высаженных в открытый грунт	Прижившихся в открытом грунте
Кандиль орловский (1924 – свободное опыление)	24ч 20°C	20	20	1	1	1
	48ч 20°C	20	20	0	0	0
	24ч 15°C	20	20	0	0	0
	48ч 15°C	20	20	0	0	0
	24ч 20°C (n)*	20	20	0	0	0
	48ч 20°C (n)	20	20	0	0	0
Афродита (814 – свободное опыление)	24ч 20°C	20	20	3	1	1
	48ч 20°C	20	20	0	0	0
	24ч 15°C	20	20	0	0	0
	48ч 15°C	20	20	0	0	0
	24ч 20°C (n)	20	20	0	0	0
Антоновка обыкновенная (свободное опыление)	24ч 20°C	20	20	4	3	3
	48ч 20°C	20	20	1	0	0
Ивановское (Уэлси×Прима)	24ч 20°C	20	20	0	0	0
	48ч 20°C	20	20	0	0	0
Всего		300	300	9	5	5

*n – проростки, плавающие в растворе колхицина.

Выводы

Проведенные исследования свидетельствуют о возможности реализации процессов регенерации сортов яблони с геном V_f *in vitro*. Подбор питательных сред на этапах введения и микроразмножения позволяет тиражировать меристему изучаемой культуры и иметь множество почек для процесса колхицинирования.

Опытный подбор почек показал, что для полиплоидизации целесообразнее использовать адвентивные, размером 3...4 и апикальные – до 5 мм.

Поступательный рост колхицинированных меристем и получение полноценных растений обеспечивает разработанная нами схема, состоящая из 6 этапов.

Возможности индуцирования полиплоидных меристематических тканей яблони с геном V_f в условиях *in vitro* зафиксированы цитологическими исследованиями.

Методом индуцированной полиплоидии получена тетраплоидная форма яблони ($2n=68$).

Литература

1. Бавтуто, Г.А. Экспериментальная автополиплоидия у яблони (*Malus Mile*) / Г.А. Бавтуто // Тез. докладов: Генетика и селекция растений. – Л., 1977. – С. 39-40.
2. Исаев, С.И. Использование полиплоидии в селекции яблони / С.И. Исаев, И.И. Домрачёва // Селекция яблони в СССР. – Орел, 1981. – С. 179-185.
3. Калинин, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев, 1980. – 240 с.
4. Лизнев, В.Н. Экспериментальная полиплоидия у яблони / В.Н. Лизнев // Научные труды. – Новосибирск, 1975. – С. 3-9.
5. Лизнев, В.Н. Создание индуцированных тетраплоидов и селекция яблони на полиплоидном уровне / В.Н. Лизнев // Селекция яблони на улучшение качества плодов. – Орел, 1985. – С. 179-185.
6. Лозицкий, А.Я. Биологическая и хозяйственная характеристика полиплоидных сортов яблони и груши: Автореферат дисс. ... на соискание ученой степени канд. биол. наук. – Л., 1970. – 20 с.
7. Пономаренко В.В. Полиплоидия видов рода *Malus Mile* / Селекция яблони на улучшение качества плодов. – ВАСХНИЛ, Орел, 1985. – С. 163-168.
8. Рыбин, В.А. Цитологический метод в селекции плодовых / В.А. Рыбин. – М.: Колос, 1967. – 216 с.
9. Седов, Е.Н. Состояние и перспективы селекции яблони на полиплоидном уровне / Е.Н. Седов, Г.А. Седышева, В.В. Жданов // Селекция яблони на улучшение качества плодов. – Орел, 1985. – С. 169-178.
10. Седов, Е.Н. Значение и задачи селекции в улучшении сортимента и интенсификации производства плодов / Е.Н. Седов // Селекция и сорторазведение садовых культур. – Орел, 1992. – С. 18-35.
11. Седышева, Г.А. Полиплоидия и селекция яблони / Г.А. Седышева // Селекция яблони в СССР. – Орел, 1981. – С. 192-198.
12. Седышева Г.А. Оценка полиплоидных форм яблони в качестве исходного материала для получения триплоидного потомства / Г.А. Седышева, Е.Н. Седов // Проблемы оценки исходного материала и подбора родительских пар в селекции плодовых растений. – Мичуринск, 1996. – С. 18-22.
13. Седышева Г.А. Эффективность использования полиплоидии в создании адаптивных сортов яблони / Г.А. Седышева, Е.Н. Седов // Роль сортов и новых технологий в интенсивном садоводстве. – Орел: ВНИИСПК, 2003. – С. 323-325.
14. Терновский, М.Ф. Преодоление бесплодия у межвидовых гибридов *Nicotiana* / М.Ф. Терновский // Полиплоидия и селекция. – М. – Л.: Наука, 1965. – С. 70-80.
15. Туз, А.С. Полиплоидия у плодовых культур / А.С. Туз // Вестник с.-х. науки. – 1965. – №6. – С. 17-21.
16. Фардзинова, И.М. Питательная среда для микроклонального размножения груши / И.М. Фардзинова // Патент РФ, №2141524, от 20.11.1999.
17. Щербаков, В.К. Методы экспериментального получения полиплоидов у растений / В.К. Щербаков // Тр. МОИП: Полиплоидия у растений. – М., 1962. – Т. V. – С. 110-120.
18. Hasskell G. Man, polyploidy and fruit tree growing in Britain. Evolution // N. J. – 1955. – P. 291-301.

References

1. Bavtuto G.A. Experimental autopolyploidy in apple (*Malus Mile*). In: Plant genetics and breeding. Leningrad, 39-40. (in Russian).

2. Isaev S.I., Domracheva I.I. (1981): Polyploidy use in apple breeding. In: Apple breeding in the USSR. Orel, 179-185. (in Russian).
3. Kalinin F.L., Sarnatskaya V.V., Polishchuk V.E. (1980): Methods of tissue culture in physiology and biochemistry. Naukova dumka, Kiev. (in Russian).
4. Liznev V.N. (1975): Experimental polyploidy in apple. In: Scientific papers of the Novosibirsk fruit and berry station. Novosibirsk, 3-9. (in Russian).
5. Liznev V.N. (1985): Creation of induced tetraploids and apple breeding on a polyploidy level. In: Apple breeding for fruit quality improvement. VNIISPK, Orel, 179-185. (in Russian).
6. Lozitskiy, A.Ya. (1970): The biological and economic characteristic of polyploidy apple and pear varieties [boil. sci. cand. thesis]. N.I.Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry, Leningrad. (in Russian).
7. Ponomarenko V.V. (1985): Polyploidy of *Malus Mile* species. In: Apple breeding for fruit quality improvement. VASKhNIL, Orel, 163-168. (in Russian).
8. Rybin V.A. (1967): Cytological method in fruit breeding. Kolos, Moscow. (in Russian).
9. Sedov E.N., Sedysheva G.A., Zhdanov V.V. (1985): The condition and prospects of apple breeding on a polyploidy level. In: Apple breeding for fruit quality improvement. VNIISPK, Orel, 169-178. (in Russian).
10. Sedov E.N. (1992): The significance and tasks of breeding in the assortment improvement and intensification of fruit production. In: Breeding and variety investigation of horticultural crops. VNIISPK, Orel, 18-35. (in Russian).
11. Sedysheva G.A. (1981): Polyploidy and apple breeding. In: Apple breeding in the USSR. VNIISPK, Orel, 192-198. (in Russian).
12. Sedysheva G.A., Sedov E.N. (1996): The assessment of polyploidy apples as initial material for triploid progeny obtaining. In: Problems of the initial material assessment and selection of parent pairs in fruit plant breeding. VNIIS, Michurinsk, 18-22. (in Russian).
13. Sedysheva G.A., Sedov E.N. (2003): The efficiency of polyploidy use in the development of adaptive apple varieties. In: A role of varieties and new technologies in the intensive horticulture. VNIISPK, Orel, 323-325. (in Russian).
14. Ternovskiy M.F. (1965): Sterility overcoming in interspecific *Nicotiana* hybrids. In: Polyploidy and breeding. Nauka, Moscow, Leningrad, 70-80. (in Russian).
15. Tuz A.S. (1965): Polyploidy in fruit crops. Vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki [Agricultural science newsletter], 6: 17-21. (in Russian).
16. Fardzinova I.M. (1999): Nutrient media for microclonal pear propagation. RF patent, №2141524, 20 november 1999. (in Russian).
17. Shcherbakov V.K. (1962): Methods of the experimental obtaining of polyploids in plants. In: Polyploidy in plants, 5: 110-120. (in Russian).
18. Hasskell G. (1955): Man, polyploidy and fruit tree growing in Britain. Evolution. 9(3):291-301. DOI: 10.2307/2405650