

ВОЗМОЖНОСТИ ТИРАЖИРОВАНИЯ МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ЯБЛОНИ СОРТА БОЛОТОВСКОЕ В СВЯЗИ С ВОПРОСАМИ ПОЛИПЛОИДИИ

В.Е. Джафарова, к.с.-х.н.

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

Аннотация

В статье излагаются особенности этапа пролиферации яблони сорта Болотовское *in vitro*, обладающего абсолютной устойчивостью к парше (с геном Vf). Показано влияние сред Мурасиге-Скуга (МС) и И.М. Фардзиновой (Ф) на коэффициент размножения сорта. Установлено, что развитие конгломератов с большей активностью проходит на среде Ф в разных ее модификациях. Уже в четвертом пассаже среда Ф-4 дает коэффициент размножения, равный 7. Определено, что независимо от модификации среды Ф количественный показатель почек преобладал над побегами. Использование среды Ф-4 позволило интенсифицировать этап собственно микроразмножения сорта Болотовское в 2,7 раза при среднем значении коэффициента размножения 5,3. Для получения максимального количества меристем, пригодных для колхицинирования, оптимальной является среда Ф-4. Среду И.М. Фардзиновой целесообразно включать в технологию микроклонального размножения яблони сорта Болотовское.

Ключевые слова: яблоня, *in vitro*, коэффициент размножения, микроразмножение, сорт, почки, побеги

THE POSSIBILITY OF MULTIPLICATION OF THE MERISTEMATIC TISSUES OF APPLE VARIETY 'BOLOTOVSKOYE' IN RESPECT OF MATTERS OF POLYPLOIDY

V.E. Dzhafarova, candidate of agricultural sciences

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

Abstract

Proliferation stage features of apple variety 'Bolotovskoye' *in vitro* are shown. The 'Bolotovskoye' variety is absolutely resistant to scab (Vf). The influence of Murasige-Skuga (MS) and I.M.Fardzinova (F) media on the coefficient of the variety propagation is shown. It has been determined that conglomerates are better developed on the F medium in its different modifications. Anyway during the fourth replanting, the F-4 medium gives the propagation coefficient equal to 7. It was found that the qualitative index of buds prevailed over the shoots irrespective of the F medium modification. The use of the F-4 medium made it possible to increase the micropropagation stage of 'Bolotovskoye' by 2.7 times under the average propagation coefficient 5.3. It is better to use the F-4 medium in order to obtain the maximal number of meristems suitable for treatment with colchicine. It is advisable to include this medium in the technology of microclonal apple propagation of the 'Bolotovskoye' variety.

Key words: apple, *in vitro*, propagation coefficient, micropropagation, variety, buds, shoots

Введение

Совершенствуя сортовой состав яблони, селекционеры прибегают к использованию современных методов, одним из которых является экспериментальная полиплоидия. Данный метод позволяет получать формы с кратно увеличенным набором хромосом.

Использование полиплоидов в селекционном процессе способствует сильному возрастанию изменчивости среди полового потомства полиплоидных растений, что в свою очередь, определяет реальные возможности этого направления в селекции яблони, так как селекционер получает для отбора большой объем материала с широким спектром генетического разнообразия [12].

В настоящее время сортовой состав яблони представлен огромным списком, большинство из которого диплоиды. Но наибольший хозяйственный и коммерческий интерес по совокупности хозяйственно полезных признаков представляют сорта с триплоидным набором хромосом [2, 3, 5, 10, 14].

Триплоидные сорта в настоящем представлены такими широко и давно известными как Джонаголд, Гала, Спиголд, Болдуин, Мутсу, а также современными, селекции ФГБНУ ВНИИСПК: Жилинское, Талисман, Юбиляр, Масловское, Яблочный Спас и многими, многими другими [11].

В селекции яблони интервалентные скрещивания, то есть скрещивания диплоидов с тетраплоидами, являются основой получения триплоидных сортов. В данном процессе необходимо иметь в достаточном количестве исходные формы – доноры диплоидных гамет (тетраплоиды).

На современном этапе важно индуцировать тетраплоидные формы, иммунные к парше [13], используя химические соединения (амитотики). Митотическая полиплоидизация позволяет получать измененные по уровню пloidности побеги и целые растения при действии на меристемы колхицином, аценафтенном, хлоралгидратом и другими амитотиками [4].

Известно, что, используя метод микроклонального размножения, меристематические ткани можно культивировать в большом объеме в течении круглого года. Однако при размножении растений *in vitro* проявляются различия в регенерационной способности каждого генотипа. Порой данная особенность является лимитирующим фактором в размножении требуемого сорта [1, 18].

Отсюда цель наших исследований – изучение возможности пролиферативной активности сорта Болотовское *in vitro*.

Методика исследований

Этап собственно микроразмножения проводили с учетом опыта Ф.Л. Калинина с соавторами [6], Н.И. Туровской [15] и О.А. Леонтьева-Орлова с соавторами [7]. Для размножения сорта использовали среду Мурасиге-Скуга [17]. В качестве испытуемой была среда И.М. Фардзиновой [16].

Для изучения пролиферативной активности сорта использовали растительный материал, полученный в условиях *in vitro*.

Культивирование яблони проходило в общепринятых условиях для культуры *in vitro*.

Результаты исследований

В технологии микроклонального размножения яблони у исследователей приоритетной считается искусственная питательная среда Мурасиге-Скуга [7, 9, 15].

Наши ранние исследования [3] с использованием среды МС (по прописи) для микроразмножения сортов яблони показали, что данная среда не обеспечивал массовое и стабильное пролиферирование, поскольку регенерационная способность оказалась слишком низкой. Коэффициент размножения был 1,0...1,2.

Чтобы повысить эффективность развития сортов *in vitro* состав среды МС нами был незначительно модифицирован. Данный вариант среды содержал двойной объем хелата железа, РР – 0,5 мг/л, В₁ – 0,4 мг/л, В₆ – 0,1 мг/л, С – 1,5 мг/л, инозит – 0 мг/л. У эксплантов на такой

среде было отмечено хорошее развитие конгломератов. При концентрации цитокинина БАП 1 мг/л коэффициент размножения повысился всего лишь до 1,4...1,7, а при концентрации 2 мг/л – находился в зависимости от сорта в пределах 2,0...2,7.

При таком коэффициенте размножения невозможно достигнуть массового пролиферирования меристем, необходимого для процесса колхичинирования. Используя модифицированный вариант среды было установлено, что от сорока конгломератов можно было отобрать всего лишь до 80 почек (для вычленения меристем на колхичинирование). Этот объем не позволил нам в полной мере (с учетом методической выдержанности) провести исследования.

Подобное развитие яблони на этапе собственно микроразмножения говорит лишь о способности сортов к развитию в условиях *in vitro*.

Для интенсивного пролиферирования яблони необходимо было найти условия культивирования, способствующие активному росту конгломератов (почек и побегов).

Изучая практический опыт И.М. Фардзиновой [16] по культивированию *in vitro* груши сорта Кюре было замечено, что предлагаемая ею питательная среда позволяет от единичного побега получать конгломераты в виде почек и побегов, количество которых достигало 40...45 единиц на один конгломерат.

Учитывая подобную высокую результативность и необходимость повышения количественного уровня меристем для колхичинирования нами было проведено изучение пролиферативной активности яблони сорта Болотовское на средах Мурасиге-Скуга и И.М. Фардзиновой.

Исследования показали, что микроразмножение сорта Болотовское с большей активностью проходит на среде Ф (таблица 1, рисунок 1а, 1б, 2).

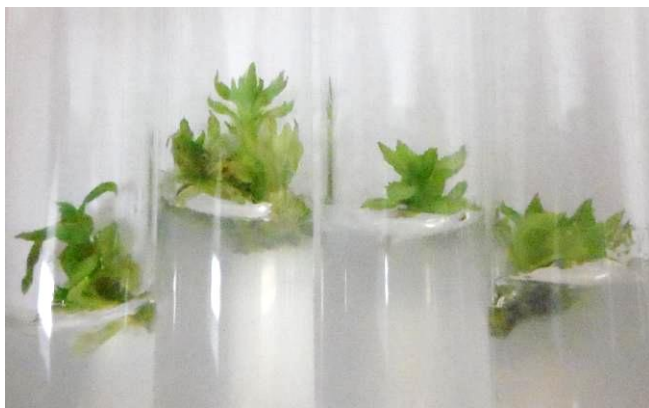
Таблица 1 – Коэффициент размножения сорта Болотовское в зависимости от количества субкультивирований

Пассажи	Питательная среда					
	МС-1	МС-2	Ф-2	Ф-3	Ф-4	Ф-5
I	2,0±0,5	2,2±0,5	3,3±0,7	2,4±0,6	3,8±0,5	4,5±0,6
II	1,7±0,2	1,8±0,1	1,8±0,2	2,1±0,4	4,9±1,2	4,6±1,0
III	1,7±0,1	2,4±0,3	2,7±0,3	2,6±0,2	7,0±1,0	4,5±0,5
IV	1,8±0,1	2,4±0,3	3,5±0,2	2,5±0,3	5,4±1,0	3,9±0,2

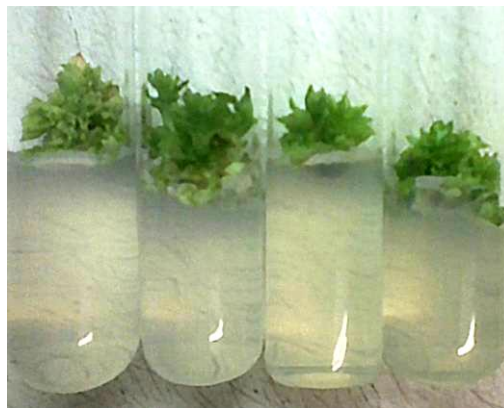
Примечание: МС-1 – среда МС + 1 мг/л БАП; МС-2 – среда МС + 2 мг/л БАП; Ф-2 – среда Ф с крайним наименьшим значением компонентов + 1 мг/л БАП; Ф-3 – среда Ф с крайним наибольшим значением компонентов + 1 мг/л БАП; Ф-4 – среда Ф с крайним наименьшим значением компонентов + 2 мг/л БАП; Ф-5 – среда Ф с крайним наибольшим значением компонентов + 2 мг/л БАП.

Коэффициент размножения сорта Болотовское на среде МС не выделялся высоким значением и его стабильным увеличением. Развитие конгломератов сорта на среде Ф в разных ее модификациях проходило более интенсивно. При использовании сред Ф-2 и Ф-3 хотя и не наблюдалось постепенного увеличения коэффициента размножения сорта от первого пассажа к четвертому, тем не менее этот показатель был выше, чем на среде МС. Коэффициент размножения на среде Ф-4 уже в третьем пассаже достигал 7. Среда Ф-5 отличалась стабильным пролиферированием на протяжении первых трех пассажей.

Независимо от концентрации цитокинина (6-БАП) на среде Ф в четырех ее модификациях преобладала пролиферация почек над побегами (таблица 2). Если пролиферация почек сорта на среде МС колебалась от 0,8 до 1,9 на конгломерат, то на среде Ф (2 – 5) от 0,9 до 6,0. В среднем этот показатель увеличился от 1 на среде МС-1 до 4 на среде Ф-4. Следует отметить, что на всех средах Ф и во всех пассажах конгломераты сорта имели здоровый вид и интенсивную зеленую окраску почек и побегов, отсутствовала витрификация и некроз тканей, которые можно было наблюдать на среде МС.



а – на среде МС-1



б – на среде Ф-3

Рисунок 1 – Проллиферативная активность сорта Болотовское



Рисунок 2 – Разделенный конгломерат сорта Болотовское со среды Ф-4

Таблица 2 – Проллиферативная активность яблони сорта Болотовское

Искусственная питательная среда		МС-1	МС-2	Ф-2	Ф-3	Ф-4	Ф-5
I пассаж	Соотношение почек и побегов	1,1:0,9	1,2:1,0	2,5:0,8	1,6:0,8	2,8:1,0	3,6:0,9
	Средняя высота побега, мм	8,1±2,8	7,1±3,0	6,6±2,2	6,6±2,0	7,3±3,0	6,7±2,1
II пассаж	Соотношение почек и побегов	0,8:0,9	0,9:0,9	0,9:0,9	1,1:1,0	4,1:0,8	3,8:0,8
	Средняя высота побега, мм	8,1±1,2	6,7±1,3	6,7±1,8	7,4±1,0	7,2±1,2	6,5±0,8
III пассаж	Соотношение почек и побегов	1,1:0,6	1,9:0,5	1,8:0,9	1,4:1,2	6,0:1,0	3,8:0,7
	Средняя высота побега, мм	7,7±1,6	7,4±0,6	6,9±1,3	7,5±1,2	6,7±1,1	6,3±1,2
IV пассаж	Соотношение почек и побегов	0,9:0,9	1,8:0,6	2,1:1,4	1,2:1,3	4,6:0,8	3,6:0,3
	Средняя высота побега, мм	7,0±1,7	7,5±1,6	7,0±1,0	9,2±2,8	5,9±1,1	5,3±0,7

На основании сравнительных результатов культивирования сорта на представленных средах можно заключить, что для более интенсивного пролиферирования яблони сорта Болотовское целесообразнее использовать среду И.М. Фардзиновой. Модификация среды подбирается в зависимости от направленности исследований и практической потребности в материале.

Выводы

Использование среды И.М. Фардзиновой позволяет интенсифицировать этап собственно микроразмножения, повысить коэффициент размножения в среднем с 1,8 до 5,3 при этом не снизив качества конгломератов сорта Болотовское. Настоящие исследования свидетельствуют о целесообразности включения среды Ф в технологию микроразмножения яблони сорта Болотовское.

Литература

1. Бартиш И.В., Корховой В.И., Меркулов С.М., Копань В.П. Оптимизация методов культивирования *in vitro* различных сортов и клоновых подвоев яблони (*Malus domestica* Borkh) // Физиология и биохимия культурных растений. 1994. Т. 26. №6. С. 587-594.
2. Вартапетян В.В., Кошечкова Т.В. Наследование содержания витамина С в плодах при скрещивании сортов яблони разной ploидности // Селекция яблони на улучшение качества плодов. – Орел, 1985. С. 186-190.
3. Джафарова В.Е. Особенности микроклонального развития сортов яблони с геном Vf в связи с вопросами полиплоидии // Селекция и сорторазведение садовых культур. – Орел: ВНИИСПК, 2007. С. 80-85.
4. Дубровский М.Л., Лыжин А.С., Ван-Ункан Н.Ю. Получение и отбор генотипов плодовых и ягодных культур с измененным уровнем ploидности // Методика. – Мичуринск, 2013. 52 с.
5. Исаев С.И., Домрачева И.И. Использование полиплоидии в селекции яблони // Селекция яблони в СССР. – Орел, 1981. С. 179-185.
6. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии. – Киев, 1980. 240 с.
7. Леонтьев-Орлов, О.А., Трушечкин В.Г., Высоцкий В.А. Особенности культивирования изолированных апексов яблони *in vitro* // Плодоводство в нечерноземной полосе. – М., 1988. С. 21-30.
8. Лоцицкий А.А. Биологическая и хозяйственная характеристика полиплоидных сортов яблони и груши: Автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. биол. наук – Л., 1970. 20 с.
9. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Технология клонального микроразмножения яблони и груши // Методические рекомендации. – Мичуринск, 2008. 35 с.
10. Пономаренко В.В. Полиплоидия видов рода *Malus* Mill / В.В. Пономаренко // Селекция яблони на улучшение качества плодов. – Орел: ВАСХНИЛ 1985. С. 163-168.
11. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М., Ульяновская Е.В. Создание триплоидных сортов открывает новую эру в селекции яблони // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. 2013. №2. С. 33-37.
12. Седышева Г.А., Седов Е.Н. Оценка полиплоидных форм яблони в качестве исходного материала для получения триплоидного потомства // Проблемы оценки исходного материала и подбора родительских пар в селекции плодовых растений. – Мичуринск, 1996. С. 18-22.
13. Седышева Г.А., Седов Е.Н. Эффективность использования полиплоидии в создании адаптивных сортов яблони // Роль сортов и новых технологий в интенсивном садоводстве. – Орел: ВНИИСПК, 2003. С. 323-326.
14. Туз А.С., Лоцицкий А.А. Полиплоидия у яблони и груши // Цитологические методы в селекции плодовых и ягодных культур. – М.: Колос, 1973. С. 106-109.
15. Туровская Н.И. Микроразмножение яблони и груши *in vitro* // Садоводство и виноградарство. 1988. №1. С. 10.

16. Фардзинова И.М. Питательная среда для микроклонального размножения груши // Патент РФ, №2141524, от 20.11.1999.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia plantarum*. 1962. V. 15. №13. P. 473-497.
18. Zimmerman R.H. Apple. Handbook of plant cell culture. – New York: Macmillan. 1984. Vol. 2. P. 369-395.

References

1. Bartish I.V., Korkhovoy V.I., Merkulov S.M., Kopan V.P. (1994): Optimization of micropropagation for different scions and rootstocks of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Physiology and biochemistry of cultivated plants*, 26: 587-594. (In Russian).
2. Vartapetyan V.V., Koshechkova T.V. (1985): Vitamin C content inheritance in fruit when crossing apple cultivars of different ploidy. In: *Apple breeding for fruit quality improvement*. Orel, VNIISPK: 186-190. (In Russian).
3. Dzharfarova V.E. (2007): Features of microclonal development of apple cultivars having Vf gene in connection with polyploidy questions. In: *Breeding and variety cultivation of fruit and berry crops*. Orel, VNIISPK: 80-85. (In Russian).
4. Dubrovskiy M.L., Lyzhin A.S., Van-Unkan N.Yu. (2013): Development and selection of fruit and berry genotypes with changed polyploidy level (Method). Michurinsk, VNIIGiSPR. (In Russian).
5. Isaev S.I., Domracheva I.I. (1981): Polyploidy use in apple breeding. In: *Apple breeding in the USSR*. Orel, VNIISPK: 179-185. (In Russian).
6. Kalinin F.L., Sarnatskaya V.V., Polishchuk V.E. (1980): *Methods of tissue culture in physiology and biochemistry*. Kiev, Naukova dumka. (In Russian).
7. Leontev-Orlov O.A., Trushechkin V.G., Vysotskiy V.A. (1988): Features of cultivation of isolated apple apexes in vitro. In: *Fruit-growing in the Nechernozem zone*. Moscow, Scientific-Research Institute of Non-chernozem zone the strip gardening: 21-30. (In Russian)
8. Lozitskiy, A.Ya. (1970): The biological and economic characteristic of polyploidy apple and pear varieties [boil. sci. cand. thesis]. N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Recourses (VIR), Leningrad. (In Russian).
9. Matushkina O.V., Pronina I.N. (2008): *Technology of clonal apple and pear micropropagation (methodical recommendations)*. Michurinsk, VSTISP. (In Russian).
10. Ponomarenko V.V. (1985): Polyploidy of *Malus* Mile species. In: *Apple breeding for fruit quality improvement*. Orel, VASKhNIL: 163-168. (In Russian).
11. Sedov E.N., Sedysheva G.A., Serova Z.M., Uliyanovskaya E.V. (2013): Creating triploid varieties opens the new era in apple tree breeding. *Herald of Russian Academy of Agricultural Sciences*, 2: 33-37. (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*. Michurinsk, VNIIS: 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*. Orel, VNIISPK: 323-325. (In Russian).
14. Tuz A.S., Lozitskiy A.A. (1973): Polyploidy in apple and pear. In: *Cytological methods in fruit and berry breeding*. Moscow, Kolos: 106-109. (In Russian).
15. Turovskaya N.I. (1988): Apple and pear micropropagation in vitro. *Horticulture and viticulture*, 1: 10. (In Russian).
16. Fardzinova I.M. (1999): Nutrient media for microclonal pear propagation. RF patent, №2141524, 20 November 1999. (In Russian).
17. Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(13): 473-497.
18. Zimmerman R.H. (1984): Apple. In: *Handbook of plant cell culture*, New York, MacMillan Publishing Co, 2: 369-395].