

ИНДУЦИРОВАНИЕ ТЕТРАПЛОИДОВ ЯБЛОНИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Л.В. Ташматова , О.В. Мацнева, В.В. Шахов

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

Аннотация

В статье приведены результаты исследований возможности колхицинирования почек и верхушек побегов яблони сортов Болотовское, Имрус и Ветеран в условиях *in vitro*. Описаны условия увеличения сроков воздействия амитотиком на меристемы яблони. Показан положительный эффект от использования питательной среды Кворина – Лепуавра на продолжительность воздействия колхицином в концентрациях 0,01 и 0,02%. Наибольшее время воздействия колхицином на меристемы яблони сорта Имрус – 288 часов (12 суток) с концентрацией амитотика 0,02%, у сорта Болотовское – 288 часов с концентрацией колхицина 0,01%. Для сорта Ветеран – 120 часов при концентрации колхицина 0,02%.

Отмечено эффективное использование среды Кворина-Лепуавра на дальнейшее развитие микропобегов яблони. К третьему пассажу коэффициент размножения достигал значения 5. Образовывались почки, а также побеги пригодные для укоренения.

Ключевые слова: полиплоидия, яблоня, сорта, триплоиды, тетраплоиды, колхицин, *in vitro*

INDUCING OF APPLE TRIPLOIDS IN VITRO

L.V. Tashmatova , O.V. Matzneva, V.V. Shakhov

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

Abstract

The possibilities of colchicines treatment of buds and shoot tips of apple varieties Bolotovskoye, Imrus and Veteran *in vitro* have been studied. The results of the studies are given. The conditions for increasing the time of exposure of amitotic on apple meristems are described. The positive effect of the use of the nutrient medium QL on the duration of exposure to colchicine at concentrations of 0.01 and 0.02% is shown.

The maximum time of exposure of Imrus meristems to colchicine was 288 hours (12 days) with amitotic concentration 0.02%; in the Bolotovskoye variety it was 288 hours with colchicines concentration 0.01%; in the Veteran variety it was 120 hours with colchicines concentration 0.02%.

The efficient use of QL nutrient medium on the further development of apple micro shoots has been observed. In three months of the cultivation the coefficient of the development reached a value of 5. Buds as well as shoots sufficient for rooting were formed.

Key words: polyploidy, apple, varieties, triploids, tetraploids, colchicines, *in vitro*

Введение

Одним из направлений эволюции растений является полиплоидия – кратное увеличение числа хромосом, которое приводит к нарушению сложившегося уровня ploидности. В естественных условиях это происходит под влиянием различных природных факторов – температуры, инсоляции, естественной гибридизации. В результате такого воздействия получают спонтанные полиплоиды. К таковым относят многие виды культурных растений, таких как зерновые, картофель, сахарный тростник, табак, слива домашняя [6, 10]. Известны спонтанные полиплоиды и среди сортов яблони – Антоновка плоская, Уэлси, Суворовец, Боровинка [13].

Явление полиплоидии может привести к нарушению репродуктивных процессов, вплоть до полной стерильности. Однако есть и положительные стороны, а именно благодаря изменению химического состава повышается зимостойкость и засухоустойчивость, устойчивость к болезням.

Большинство культурных сортов яблони являются диплоидами ($2n=34$). Среди полиплоидов яблони известны так же триплоиды и тетраплоиды.

Тетраплоиды ($4n=68$) не имеют хозяйственного значения, а служат исходным материалом для селекции на полиплоидном уровне в качестве доноров диплоидных гамет. Среди спонтанных тетраплоидов можно выделить такие сорта как Мелба, Уэлси, Голден Делишес, Спартан, Делишес, Папировка.

По мнению ряда исследователей, особенно полезной для улучшения хозяйственных показателей сортов яблони оказалось трехкратное увеличение хромосом ($3n=51$) [1, 13, 14, 18]. В хозяйственных насаждениях Европы и США были популярны триплоидные сорта Мутсу, Джонаголд, Спиголд, Болдуин, Боскопская красавица, Графенштейнское, Зеленка Род Айлендская, Кармин де Соньевилле, Красное Айзера, Лимонное зимнее, Брамлис Сидлинг [3, 9, 12, 15, 17].

Триплоиды можно получить через интервалентные скрещивания диплоид \times триплоид (из-за высокой стерильности триплоидов их лучше брать в качестве материнского растения). Но для большей результативности исследователи рекомендуют использовать скрещивания диплоид \times тетраплоид или тетраплоид \times диплоид [1]. А так как тетраплоидные гибриды через диплоидные и нередуцированные гаметы передают потомству детерминированные особенности в практически неизменном виде необходимо создание коллекции тетраплоидов от известных ценных в селекционном отношении сортов. Для этого можно использовать один из методических приемов – индуцирование полиплоидов с помощью химических соединений в условиях *in vitro*.

Из-за меньшей токсичности и большой биологической активности предпочтение в экспериментах отдается алкалоиду – колхицину [14, 16]. С использованием колхицина были созданы полиплоидные сорта плодовых и ягодных культур [2, 7]. К колхиплоидам относят такие сорта яблони как Мелба, Спартан, Джонатан, Патриция [11, 13].

Впервые работа по индукции тетраплоидов яблони путем колхицинирования меристем была проведена Дерменом и Лизневым [7]. Однако, предложенные ими способы оказались малоэффективным из-за слабого проникновения раствора колхицина через клеточные стенки, а также из-за быстрого прекращения роста побегов [7].

Меристематические ткани в культуре *in vitro* являются подходящим материалом благодаря практически непрекращающемуся росту побегов, что при наличии достаточного количества материала дает возможность проводить колхицинирование круглый год.

Место проведения, методика и объекты исследования

Исследования проводили в лаборатории биотехнологии ВНИИСПК. Колхицинирование

меристем проводили в условиях *in vitro* с учетом ранее накопленного опыта работы [4, 5]. В качестве полиплоидизирующего вещества был использован колхицин в концентрации 0,01, 0,02%, который вводили в состав питательной среды. Время экспозиции 24, 48, 72, 120 часов, 9 суток, 12 суток. Боковые почки и верхушки молодых растущих побегов размером до 5 мм высаживали на питательные среды Мурасиге-Скуга (МС) и Кворина-Лепуавра (QL), содержащих колхицин в указанных концентрациях. Дальнейшее культивирование колхицинированных меристем проводили на питательной среде QL с добавлением БАП 0,5 и 1,0 мг/л.

Объектами изучения служили 3 сорта яблони селекции ВНИИСПК – Имрус, Болотовское и Ветеран.

Результаты исследований

Одной из задач данного исследования являлось отработка приемов индукции тетраплоидов яблони в культуре *in vitro*. Исследование показало, что концентрация амитотика, время его воздействия и тип питательной среды оказывают влияние на приживаемость и дальнейшее развитие почек и верхушек побегов яблони.

При культивировании на питательной среде МС с 0,01 и 0,02% содержанием колхицина более 72 часов почки и верхушки побегов яблони становились нежизнеспособными и погибали от некроза. Цитологический анализ полученных растений яблони наличие тетраплоидов пока не выявил. Возможно, это связано было с ограниченным количеством растений, переданных на анализ. Поэтому было оставлено время экспозиции – 24, 48 и 72 часа. Но в тоже время на основе питательной среды QL провели колхицинирование меристем, увеличив время экспозиции до 12 суток (288 часов) (таблица 1). Дальнейшее увеличение времени приводило к гибели эксплантов.

Таблица 1 – Колхицинирование меристем яблони на питательной среде QL

Сорт	Концентрация колхицина, %	Временная экспозиция, час	Число обработанных меристем, шт.	Число прижившихся меристем, шт.	% прижившихся меристем
Колхицин в среде					
Имрус	0,01	120	54	52	96,3
Имрус	0,02	24	22	10	45,4
Имрус	0,02	72	16	11	62,5
Имрус	0,02	120	39	13	33,3
Имрус	0,02	216	10	4	40,0
Имрус	0,02	288	10	2	20,0
Болотовское	0,01	120	60	55	91,7
Болотовское	0,01	288	29	4	13,8
Болотовское	0,02	24	40	25	62,5
Болотовское	0,02	48	35	12	34,3
Болотовское	0,02	72	100	33	33,0
Болотовское	0,02	120	39	13	33,3
Ветеран	0,02	120	20	18	90,0

Полученные результаты показали, что у сортов Имрус и Болотовское чем больше концентрация колхицина и время экспозиции, тем меньше процент прижившихся почек. Однако тот факт, что часть меристем все же прижилась, дает основание применять данные варианты колхицинирования, а возможно еще увеличивать время экспозиции, поскольку

это увеличивает шанс получить тетраплоидные растения сотов яблони.

С 2017 года в процесс колхицинирования включен сорт Ветеран. При концентрации амитотика 0,02% и времени его воздействия 120 часов получили достаточно высокий процент жизнеспособных почек – 90%. Что говорит о возможности в дальнейших экспериментах повышать продолжительность экспозиции почек данного сорта.

Каждая отдельная меристема представляет собой отдельный клон, требующий своей нумерации. Это позволит проследить развитие от 1 меристемы целой линии растений до цитологического анализа, благодаря чему не потребуется проводить анализ всех полученных растений, а только одного из каждой отдельно взятой линии.

Эксперимент показал, что состав питательной среды играет важную роль в процессе колхицинирования почек. Замена питательной среды МС на QL с добавлением 6-БАП 0,5 мг/л позволила увеличить время воздействия амитотиком на меристемы.

Дальнейшее культивирование колхицинированных почек и верхушек побегов проводили на питательной среде QL с добавлением в ее состав 6-БАП в концентрации 1,0 мг/л.

В первом пассаже коэффициент размножения был равен 1. К третьему пассажу он достигал 5. При этом длина побегов сильно варьировала от почки до 30 мм, т. е. образовывались побеги пригодные для укоренения. В ходе культивирования микропобегов яблони на среде QL не было отмечено витрификации и деформации тканей. Растения имели ярко-зеленую окраску.

Выводы

Полученные результаты показывают, что путем подбора питательных сред, можно увеличить время культивирования колхицинированных почек и верхушек побегов на питательной среде, содержащей колхицин в концентрациях 0,01 и 0,02% до 288 часов, что повышает вероятность получения полиплоидных растений сортов яблони.

Питательная среда Кворина-Лепуара оказала положительное влияние на процессы колхицинирования почек в культуре *in vitro* и их дальнейшее микроразмножение.

Литература

1. Бавтуто Г.А. Создание исходного селекционного материала яблони методом индуцированной полиплоидии // Селекция яблони в СССР. – Орел: ВНИИСПК, 1977. С.186-191.
2. Баранов П.А., Матвеева Т.С. Значение полиплоидии в экспериментальной ботанике // Полиплоидия у растений. – М.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 11-20.
3. Витковский В.Л. Плодовые растения мира. – СПб. [и др.] : Лань, 2003. 591 с.
4. Джафарова, В. Е. Особенности микрклонального развития сортов яблони с геном Vf в связи с вопросами полиплоидии // Селекция и сортоизучение садовых культур. – Орел: ВНИИСПК, 2007. С. 80-85.
5. Джафарова В.Е. Особенности микрклонального развития яблони с геном Vf и возможности индуцирования полиплоидных меристем в условиях *in vitro* // Научно-методический электронный журнал Концепт. 2013. Т. 3. С. 446-450.
6. Жуковский П.М. Эволюционные аспекты полиплоидии у растений // Полиплоидия и селекция. – Минск : Наука и техника, 1972. С. 9-18.
7. Кичина В.В., Огольцова Т.П. Экспериментальная полиплоидия в селекции красной малины // Плодоводство и ягодоводство нечерноземной полосы. 1971. Т. 3. С. 370-373.
8. Лизнев В.Н. Экспериментальная полиплоидия у яблони // Труды Новосибирской плодово-ягодной опытной станции им. И. В. Мичурина. – Новосибирск, 1975. Вып.2. С. 3-9.

9. Лизнев В.Н. Создание индуцированных тетраплоидов и селекция яблони на полиплоидном уровне // Селекция яблони на улучшение качества плодов. – Орел: ВНИИСПК, 1985. С. 179-184.
10. Папихин Р.В., Муратова С.А., Лучникова С.В. Влияние колхицина и аценафтена на меристематические ткани плодовых и ягодных культур в условиях *in vitro* // Проблемы агроэкологии и адаптивность сортов в современном садоводстве России: мат. Всеросс. Науч-метод. конф. (1-4 июля 2008г., Орел) – Орел : ВНИИСПК, 2008. С. 213-217.
11. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Жданов В.В. Состояние и перспективы селекции яблони на полиплоидном уровне // Селекция яблони на улучшение качества плодов. – Орел: ВНИИСПК, 1985. С. 169-176.
12. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М., Ульяновская Е.В. Полиплоидия – как инновационный прием в селекции яблони // Садоводство и виноградарство. 2011. № 6. С. 35- 41.
13. Седышева Г.А., Седов Е.Н. Полиплоидия и селекция яблони – Орел: ВНИИСПК, 1994. 272 с.
14. 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 : ВНИИС, 1996. С. 18-22.
15. Терновский М.Ф. Преодоление бесплодия у межвидовых гибридов *Nicotiana* // Полиплоидия и селекция. – М.,Л. : Наука, 1965. С. 70-80.
16. Туз А.С., Лозинский А.Я. Полиплоидные яблони и груши // Генетика. 1970. Т. 6. №9. С. 41-50.
17. Шмук А.А. Гусева А.И. Химическое строение веществ, вызывающих полиплоидию растений // Доклады АН СССР. 1939. Т. 24. №5. С. 441-445.
18. Bacharach A. Triploid apple cultivars have advantages. // Western Fruit Grower. 1982. V. 102. N.6. P.32.
19. Singh R., Wafai B. A. Intravarietal polyploidy in the apple (*Malus pumila* Mill.) cultivar Hazratbali // Euphytica. 1984. Т. 33. №. 1. С. 209-214.

References

1. Bavtuto, G.A. (1981). Creation of initial breeding apple material by means of induced polyploidy. In *Apple breeding in the USSR* (pp 186-191). Orel: NIISPK. (In Russian).
2. Baranov, P.A. & Matveeva, T.S. (1962). Polyploidy importance in experimental botany. In *Polyploidy in plants* (pp 11-20). Moscow: AN SSSR. (In Russian)..
3. Witkowski, V.L. (2003). *Fruit plants of the world*. Lan, Saint Petersburg. (In Russian).
4. Dzhafarova, V.E. (2007). Microclonal growth peculiarities of apple varieties with gene V_f in connection with polploidy. In *Breeding and variety development of horticultural crops* (pp 80-85). Orel: VNIISPK. (In Russian, English abstract).
5. Dzhafarova, V.E. (2013). Features micropropagation of apple gene V_f and the possibility of inducing polyploid meristems of *in vitro*. *Periodic scientific and methodological e-journal "Koncept"*, 3, 446-450. Retrieved from: <http://e-koncept.ru/2013/53091.htm>. (In Russian, English abstract).
6. Zhukovskiy, P.M. (1972). Evolution aspects of polyploidy in plants. *Polyploidy and breeding* (pp 9-18). Minsk: Nauka y Tekhnika. (In Russian).
7. Kichina, V.V. & Ogoltsova, T.P. (1971). Experimental polyploidy in red raspberry breeding. *Fruit and berry growing of Nechernozem Zone*, 3, 370-373. (In Russian).

8. Liznev, V.N. (1975). Experimental polyploidy in apple. *Proceedings. I.V. Michurin Novosibirsk Zonal Fruit and Small Fruit Experimental Station*, 2, 3-9. (In Russian).
9. Liznev, V.N. (1985). Creation of induced tetraploids and apple breeding on a polyploidy level. In *Apple breeding for fruit quality improvement* (pp 179-184). Orel: NIISPK. (In Russian).
10. Papikhin, R.V., Muratova, S.A. & Luchnikova S.V. (2008). Colchicines and acenaphthene effect on meristem tissues of fruit and berry crops *in vitro*. In *Proc. Sci. Conf. Problems of horticultural ecology and cultivar adaptivity in modern horticulture of Russia* (pp 213-217). Orel: VNIISPK. (In Russian, English abstract).
11. 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* (pp 169-178). Orel: VNIISPK. (In Russian).
12. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., Serova, Z.M. & Ulyanovskaya, E.V. (2011). Polyploidy as innovational method in apple breeding. *Horticulture and viticulture*, 6, 35- 41. (In Russian, English abstract).
13. Sedysheva, G.A. & Sedov, E.N. (1994). *Polyploidy and apple breeding*. Orel: VNIISPK. (In Russian).
14. 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* (pp 18-22). Michurinsk, VNIIS. (In Russian).
15. Ternovskiy, M.F. (1965). Sterility overcoming in interspecific *Nicotiana* hybrids. In *Polyploidy and breeding* (pp 70-80). Moscow, Leningrad: Nauka. (In Russian).
16. Tuz, A.S. & Lozinskiy, A.Ya. (1970). Polyploid apple and pear varieties. *Genetika*, 6(9), 41-50. (In Russian)
17. Shmuk, A.A. & Guseva A.I. (1939). Chemical composition of substances that cause polyploidy. *Proceedings of the USSR Academy of Sciences*, 24(5), 441-445. (In Russian).
18. Bacharach, A. (1982). Triploid apple cultivars have advantages. *Western Fruit Grower*, 102(6), 32.
19. Singh, R. & Wafai, B.A. (1984). Intravarietal polyploidy in the apple (*Malus pumila* Mill.) cultivar Hazratbali. *Euphytica*, 33(1), 209-214.