

ПОЛУЧЕНИЕ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ ЯБЛОНИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

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

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

Аннотация

В нашей стране современный сортимент яблони в хозяйствах и на приусадебных участках в большинстве своем представлен диплоидами. В промышленном отношении наибольшее значение имеют триплоиды. Триплоидные формы получают в результате скрещивания $2n \times 2n$ или $2n \times 4n$. Особый интерес для селекции представляет индуцирование тетраплоидов уже имеющихся сортов с помощью полиплоидизирующих веществ. В качестве последних, чаще используют колхицин. Успех получения большого количества тетраплоидных форм в условиях *in vitro* зависит от достаточного количества исходного материала для колхицинирования. Одним из этапов, от успеха, которого зависит вся дальнейшая работа, является этап введения в культуру. Важными вопросами являются состав питательных сред и сроки введения в культуру *in vitro* эксплантов яблони. Проведены исследования по изучению влияния сроков введения в культуру тканей на приживаемость и развитие эксплантов яблони сортов Болотовское, Имрус, Ветеран, Орловское полосатое, Орлик, Орловское полесье, Кандиль орловский, Веняминовское, Память воину, Афродита. Было установлено, что при введении в культуру *in vitro* в период начала роста (март – апрель), снижаются уровень окисления питательной среды фенольными соединениями и зараженность эксплантов грибной инфекцией, что позволяет повысить выход исходного материала для дальнейших исследований. У эксплантов, введенных в период начала роста, окисление в среднем составило – 73%, в период активного роста – 100%, в период окончания роста – 57,4. 100% окисление было только у Имруса, Кандиля орловского и Памяти воину. Установлено, что на питательной среде QL жизнеспособность эксплантов была выше, чем на среде Мурасиге-Скуга.

Ключевые слова: яблоня, *in vitro*, полиплоидия, сроки введения, питательная среда

INITIAL MATERIAL FOR APPLE POLYPLOIDIZATION IN CULTURE *IN VITRO*

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

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

Abstract

In Russia in industrial and amateur orchards the apple assortment mostly consists of diploids. Triploids are more important in industrial respect. Triploids are obtained as a result of crossings $2n \times 2n$ or $2n \times 4n$. The inducing of tetraploids of already existing varieties with the assistance of polyploidizing substances is of particular interest. Colchicine is more often used as such substance. The success of

obtaining a large amount of tetraploids *in vitro* depends on the sufficient quantity of initial material for colchicines treatment. The stage of introduction into culture is one of the significant stages for further work. Important questions are also the terms of introduction of apple explants *in vitro* and the composition of the nutrient media. The impact of the timing of the introduction into tissue culture on the survival and development of explants of such apple varieties as Bolotovskoye, Imrus, Veteran, Orlovskoe Polosatoye, Orlik, Orlovskoe Polesie, Kandil Orlovsky, Veniaminovskoye, Pamyat Voinu and Afrodita was studied. It was determined that the level of nutrient medium oxidation by phenolic compounds and the infection of explants with fungal diseases are reduced under the introduction *in vitro* in the early period of growth (in March – April). That allows increasing the output of the initial material for further studies. In explants introduced in the early period of growth the oxidation was 73%, on average; in the period of active growth – 100% and in the late period of growth – 57.4%. 100% oxidation was only in Imrus, Kandil Orlovsky and Pamyati Voinu. It was stated that on the nutrient QL medium the viability of the explants was higher than on the Murasige-Skuga medium.

Key words: apple, *in vitro*, polyploidy, introduction timing, nutrient medium

Введение

Яблоня является основной плодовой культурой, как в России, так и за рубежом. В нашей стране современный сортимент яблони в хозяйствах и на приусадебных участках в большинстве своем представлен диплоидами, половые клетки которых несут 17 хромосом. Но в природе достаточно часто встречаются и полиплоидные формы яблони – триплоиды (51 хромосомы) и тетраплоиды (68 хромосом). В промышленном отношении наибольшее значение имеют триплоиды. Проявляющийся у них эффект гетерозиса ведет к улучшению многих признаков – большая самоплодность чем у диплоидов, менее выражена периодичность плодоношения, более крупные плоды, удобная крона для сбора плодов, более высокая устойчивость к болезням, вредителям и неблагоприятным условиям среды.

Триплоидные формы получают в результате скрещивания $2n \times 2n$ или $2n \times 4n$ [3]. Особый интерес для селекции представляет индуцирование тетраплоидов уже имеющихся сортов с помощью полиплоидизирующих веществ [8]. В качестве последних, чаще используют колхицин. Такие полиплоидные формы являются донорами нередуцированных диплоидных гамет. Однако их получение затруднено из-за необходимости воздействовать на растения только в определенной стадии их развития. Как отмечают В.К. Щербаков [9], воздействовать колхицином необходимо в момент наибольшего деления клеток.

Индуцирование полиплоидов в открытом грунте оказалось не эффективным из-за быстро прекращающегося роста. Поэтому в 1986 году Марьяхиной [5] был предложен метод полиплоидизации для овощных культур в *in vitro*. Он основывается на том, что воздействуют колхицином не на сформировавшиеся побеги, а непосредственно на меристематические ткани, которые расположены в растущих верхушках или адвентивных почках. Постоянный рост обеспечивается стимуляторами роста.

В настоящее время этот метод успешно применяют в нашей стране и за рубежом для декоративных, ягодных, косточковых культур [7] и показали высокую эффективность способов полиплоидизации *in vitro*.

Успех получения большого количества тетраплоидных форм яблони зависит от многих

факторов, одним из которых является обеспечение достаточным количеством исходного материала для колхичинирования. Ранее в исследованиях нашей лаборатории были отработаны приемы микроразмножения и колхичинирования меристем яблони на примере сортов Болотовское и Имрус [2]. Задачей настоящих исследований является расширение сортимента яблони для колхичинирования *in vitro* с целью получения тетраплоидов как исходного материала для селекции на полиплоидном уровне. Для этого необходимо оптимизировать все этапы клонального микроразмножения для каждого из выбранных сортов. Одним из этапов, от успеха, которого зависит вся дальнейшая работа, является этап введения в культуру. Важными вопросами являются состав питательных сред и сроки введения в культуру *in vitro*.

Методика, объекты исследования

Объектами исследований служили сорта – Болотовское, Имрус, Ветеран, Орловское полосатое, Орлик, Орловское полесье, Кандиль орловский, Веньяминовское, Память воину, Афродита.

Исследования проводили по методике О.В. Матушкина, И.Н. Пронина [6] и Н.В. Кухарчик [3].

Стерилизацию эксплантов проводили по схеме:

1. Промывали щитки под проточной водой – 1 час;
2. Обрабатывали щитки 70% спиртом – 10 с.;
3. Промывали щитки автоклавированной дистиллированной водой – 10мин;
4. Промывали 0,1% раствором мертиолатата –10 мин.;
5. Промывали автоклавированной дистиллированной водой – 3 раза по 5мин.

Результаты исследований

Одной из проблем на этапе введения в культуру яблони является – выделение в питательную среду продуктов окисления фенольных соединений, которые ингибируют ростовые процессы экспланта и приводят к его гибели. Оптимизация сроков введения – это один из путей снятия отрицательного влияния фенолов на развитие эксплантов.

Введение в культуру *in vitro* проводили в три периода – начало роста (март – апрель), активный рост – июнь, затухание роста – конец августа – сентябрь.

Результаты проведенных исследований показали, что окисление среды фенольными соединениями происходило на всех этапах введения. Применение антиоксидантной смеси, рекомендованной Г.П. Атрощенко [1] (3 г/л аскорбиновой кислоты + ДИЕКА 1,0 г/л + + ЭДТА 1,0 г/л + глицин 5,5 г/л), положительных результатов не дало. Стопроцентное окисление среды наблюдали у эксплантов, введенных в период активного роста у всех сортов. Пересадка на новую среду через 16 часов окисления не сняла, и на следующий день оно проявлялось снова, вплоть до этапа микроразмножения. В результате чего снижался уровень приживаемости эксплантов. У эксплантов, введенных в период начала роста, окисление в среднем составило – 73%, в период окончания роста – 57,4. 100% окисление было только у Имруса, Кандиля орловского и Памяти воину. Экспланты так же пересаживали один раз на новую среду, после чего окисление вновь не проявлялось. Полученные данные по приживаемости эксплантов показывают достаточно высокий выход живых эксплантов, введенных культуру *in vitro* в летний и осенний периоды (таблица 1).

Однако, более детальный анализ этих периодов показал, что большая часть эксплантов, введенных в июне гибнет от окисления фенолами. У эксплантов, введенных в сентябре наблюдаем рост примордиальных листочков, а меристема в рост не трогается, что вероятно связано с физиологическим состоянием покоя материнского растения. У таких сортов как Кандиль орловский и Имрус очень мелкие почки и их было трудно освободить от кроющих

чешуй. В результате этого стерилизующий раствор не проникал в почку, и как следствие этого получили 100% контаминацию эксплантов.

Таблица 1 – Приживаемость эксплантов на этапе введения в различные периоды введения в культуру

Сорт	Сроки введения в культуру <i>in vitro</i>		
	Начало роста (конец марта – апрель), %	Активный рост (июнь), %	Затухание роста (конец августа – сентябрь), %
Болотовское	26,3	93,0	–
Имрус	64,4	83,3	0,0
Кандиль орловский	51,0	66,5	0,0
Орлик	27,0	60,1	62,5
Ветеран	37,5	90,5	87,5
Орловское полесье	46,1	85,7	65,6
Орловское полосатое	32,5	56,8	38,7
Афродита	27,0	75,8	95,2
Веняминовское	17,1	41,9	60,0
Память воину	2,2	43,0	70,6

На этапе введения в культуру большое значение имеет состав питательной среды. В ходе эксперимента были использованы питательные среды Мурасиге-Скуга и QL (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние состава питательных сред на приживаемость эксплантов на этапе введения

Сорта	Питательные среды	
	Мурасиге-Скуга, %	QL, %
Ветеран	0,0	37,5
Кандиль орловский	42,0	60,0
Болотовское	0,0	26,3
Орлик	40,0	47,1
Орловское полосатое	44,5	44,8

На питательной среде QL жизнеспособность эксплантов была выше, чем на среде Мурасиге-Скуга. У сортов Ветеран и Болотовское на последней среде наблюдали 100% некроз тканей. У сорта Орловское полосатое приживаемость эксплантов не отличалась на обеих средах.

На основе полученных результатов можно сказать, что для повышения выхода жизнеспособных эксплантов яблони на начальном этапе клонального микроразмножения лучше использовать для введения в культуру *in vitro* период начала роста (конец марта – апрель) в силу меньшего окисления питательной среды фенолами и активизации ростовых процессов в почке. В качестве основной питательной среды на этом этапе рекомендуется использовать питательную среду QL.

Литература

1. Атрощенко Г.П., Костицын В.В., Наделюев А.А. Рекомендации по производству оздоровленного посадочного материала земляники. – СПб: СПбГАУ, 2001. 13 с.
2. Джафарова В.Е. Оценка микроразмножения и индуцирования полиплоидных меристем и форм яблони (*Malus domestica* Borkh) // Современное садоводство – Contemporary horticulture. 2015. № 1. С. 93–99. URL: journal.vniispk.ru/pdf/2015/1/13.pdf.
3. Кухарчик Н.В., Кастрицкая М.С., Семенас С.Э., Колбанова Е.В., Красинская Т.А., Волосевич Н.Н., Соловей О.В., Змушко А.А., Божидай Т.Н., Рундя А.П., Малиновская А.М. Размножение плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro*. / под общ. ред. Н.В. Кухарчик. – Минск : Беларуская навука, 2016. 235 с.

4. Лизнев В.Н. Создание индуцированных тетраплоидов и селекция яблони на полиплоидном уровне // Сб.: Селекция яблони на улучшение качества плодов. Орел: ВНИИСПК, 1985. С.179–184.
5. Марьяхина И.Я., Полумордвинова И.В., Кокорева В.А., Луконина Е.И. Биотехнология получения фертильных форм межвидовых гибридов лука на основе полиплоидизации *in vitro* // Состояние и перспективы развития с.-х. биотехнологии. – М., 1986. С. 86-91.
6. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Технология клонального микроразмножения яблони и груши (методические рекомендации). – Мичуринск: ВСТИСП, 2008. 32с.
7. Мочалова О.В., Плаксина Т.В., Гусев Д.А., Бояндина Т.Е. Методические подходы к реконструкции генома вишни степной на гексаплоидном уровне // Вестник алтайской науки. 2014. №1 (19). С. 192-197.
8. 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 2008 г., Орел) – Орел: ВНИИСПК, 2008. С. 213–217.
9. Щербakov В.К. Методы экспериментального получения полиплоидов у растений // Полиплоидия у растений. 1962. Т. 5. С. 110–120.

References

1. Atroshchenko, G.P., Kostitsyn, V.V. & Nedelyuev, A.L. (2001). *Recommendations for production of healthy planting material of strawberry*. Saint-Petersburg: Saint-Petersburg State Agrarian University. (In Russian).
2. Dzhafarova, V.E. (2015). Estimation of propagation and inducing of polyploidy meristem and selections of *Malus domestica* Borkh. *Sovremennoe sadovodstvo – Contemporary horticulture*, 1, 93–99. Retrieved from: journal.vniispk.ru/pdf/2015/1/13.pdf.
3. Kukharchik, N.V., Kastritskaya, M.S., Semenas, S.E., Kolbanova, E.V., Krasinskaya, T.A., Volosevich, N.N., Solovei, O.V., Zmushko, A.A., Bozhidai, T.N., Rundya, A.P. & Malinovskaya, A.M. (2016). *Reproduction of fruit and berry plants in culture in vitro*. Minsk: Belaruskaya navuka. (In Russian).
4. 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).
5. Mariyakhina, I.Ya., Polumordvinova, I.V., Kokoreva, V.A. & Lukonina, E.I. (1986). Biotechnology of obtaining fertile forms of interspecific onion hybrids on the basis of polyploidization *in vitro*. In *State and prospects of the development of agricultural biotechnology* (pp. 86–91). Moscow. (In Russian).
6. Matushkina, O.V. & Pronina, I.N. (2008). *Technology of clonal apple and pear micropropagation (methodical recommendations)*. Michurinsk: VSTISP. (In Russian).
7. Mochalova, O.V., Plaksina, T.V., Gusev, D.A. & Boyandina, T.E. (2014). Methodical approaches to the reconstruction of ground cherry genome on the hexaploidy level. *Bulletin of the Altai science*, 1, 192–197. (In Russian).
8. Papikhin, R.V. Muratova, S.A. & Luchnikova, S.V. (2008). Colchicine and acenaphthene effect on meristem tissues of fruit and berry crops *in vitro*. In *Agroecology problems and adaptability of varieties in the up-to-date horticulture of Russia: Proc. Sci. Conf.* (pp. 213–217). Orel: VNIISPK. (In Russian).
9. Shcherbakov, V.K. (1962). Methods of the experimental obtaining of polyploids in plants. *Polyploidy in plants*, 5, 110–120. (In Russian).