Л. В. Ташматова, СНС, К.С.-Х.Н.

О. В. Мацнева, НС

В. В. Шахов, МНС

Т. М. Хромова, МНС

ФГБНУ ВНИИСПК, Россия, Орловская обл., д. Жилина

tashmatova@vniispk.ru

УДК 634.11:576.356

DOI 10.31676/2073-4948-2019-59-47-52

СПОСОБЫ ИНДУЦИРОВАНИЯ ТЕТРАПЛОИДНЫХ ФОРМ ЯБЛОНИ НА ОСНОВЕ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ *IN VITRO*

Реферат. Целью исследований являлась разработка методики индуцирования тетраплоидов яблони как доноров диплоидных гамет в условиях *in vitro*. Процесс получения тетраплоидов яблони проходит два этапа: 1) пролиферация с целью получения материала для колхицинирования; 2) обработка почек или верхушек побегов колхицином и микроразмножение полученных микропобегов. Применяли два способа воздействия амитотиком: добавление в состав питательной среды и капельный. Исследования показали, что колхицин не оказывает отрицательного воздействия на развитие эксплантов.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, яблоня, полиплоидизация, триплоиды, питательная среда

Summary. The aim of the research was to develop a technique for inducing apple tetraploids as donors of diploid gametes *in vitro*. The process of obtaining tetraploids apple passes two stages: 1) proliferation with the aim of obtaining material for colchicine treatment; 2) treatment of buds or shoot tips with colchicine and micropropagation of received microshoots. Two methods of amitotic exposure were used: addition to the nutrient medium and drip. Studies have shown that colchicine does not have a negative impact on the development of explants.

Keywords: clonal micropropagation, apple, polyploidization, triploids, culture medium

Введение

Одним из приоритетных направлений селекции яблони во ВНИИСПК является полиплоидия [1]. Полиплоидия — наследственные изменения, заключающиеся в кратном увеличении числа хромосом, которое приводит к нарушению сложившегося уровня плоидности. Данная мутация достаточно часто встречается в природе. В сельском хозяйстве наиболее часто возделываемыми формами культурных растений являются полиплоиды. Хорошо известны полиплоиды зерновых, картофеля, сахарного тростника, табака, сливы домашней [2, 3].

Среди возделываемых сортов яблони подавляющее большинство составляют диплоиды. Но наибольший эффект показывают триплоидные

сорта ($3n = 51$). Сорта с таким набором хромосом дают яркие и более вкусные плоды, у них более регулярное плодоношение, большая самоплодность, устойчивость к болезням [4]. Высокий процент триплоидных сеянцев получают от скрещивания тетраплоидных сортов с диплоидными сортами [5].

С точки зрения селекции и производства, важным вопросом является получение полиплоидов конкретных сортов или форм. Поэтому большое значение приобретает экспериментальная полиплоидия. Использование методов индукции полиплоидов в *in vitro* в сочетании с приемами клонального микроразмножения позволит получать и размножать в нужном количестве новые формы в течение всего года и независимо от циклов развития растений в саду. Для этого необходимо разработать эффективную методику полиплоидизации *in vitro*.

В связи с этим целью наших исследований является разработка методики индуцирования тетраплоидов яблони как доноров диплоидных гамет в условиях *in vitro*.

Материалы и методы исследований

Объекты исследования: сорта Болотовское, Имрус, Ветеран. I этап — получение растительного материала для колхицинирования.

Пассирование микропобегов проводили на питательных средах QL и Фардзиновой с добавлением БАП 1,0 и 2,0 мг/л. II этап — получение тетраплоидных форм яблони.

Колхицинирование апексов проводили в условиях *in vitro* с учетом ранее накопленного опыта работы [6, 7]. В качестве полиплоидизирующего вещества использован колхицин. Способы воздействия колхицином: 1 — введение в состав питательной среды Кворина-Лепуавра, в концентрации 0,01 и 0,02 % в различной временной экспозиции; 2 — капельный способ. Концентрация колхицина — 0,1 и 0,2 %, время экспозиции 24 и 48 часов. Для получения укорененных колхицинированных растений использовали прием микропрививки на семенные подвои с учетом рекомендаций [8].

Результаты исследований

Основная цель первого этапа — получение максимального количества материала для колхицинирования — почек и верхушек растущих микропобегов. Для увеличения коэффициента размножения были использованы различные питательные среды и высокие концентрации 6-БАП (табл. 1). Питательная среда, рекомендованная Фардзиновой, содержит половинную концентрацию макро- и микросолей среды Мурасиге-Скуга.

Исследования показали, что данная среда не оказала большого влияния на степень пролиферации (табл. 1).

Таблица 1.

Коэффициент размножения сортов яблони на различных питательных средах, шт./эксплант

Сорт	Вариант		
	QL, 1,0 мг/л 6-БАП	QL, 2,0 мг/л 6-БАП	среда Фардзиновой 2,0 мг/л 6-БАП
Болотовская	3,0±0,3	4,5±0,9	3,4±0,3
Имрус	2,5±0,8	2,1±0,5	2,6±0,7
Ветеран	2,1±0,4	1,4±0,2	2,3±0,6

Незначительное повышение коэффициента размножения было отмечено у сорта Ветеран. Ингибирующее действие оказала концентрация БАП 2,0 мг/л на среде QL у сортов Ветеран и Имрус, в то время как у сорта Болотовское наибольший коэффициент размножения наблюдали именно в этом варианте. Он составил 4,5. Что говорит о генотипической реакции исследуемых сортов на минеральный состав питательных сред и концентрацию 6-БАП.

Для обработки полиплоидогеном брали почки и апикальные части растущих микропобегов длиной 2-3 мм и помещали на питательную среду QL (БАП 0,5 мг/л) с колхицином в концентрации 0,01 и 0,02 % в различной временной экспозиции. Был применен также капельный способ, когда амитотик наносили на побег или почку с помощью пипетки. Затем экспланты промывали в стерильной дистиллированной воде.

Апексы, подвергшиеся колхицинированию, высаживали на новую среду без колхицина, но содержащую БАП в концентрации 0,5 мг/л. Срок пассирования 4 недели. За это время они увеличиваются в размерах или вырастают в короткие микропобеги. Дальнейшее их культивирование после обработки колхицином проводили на питательной среде QL на фоне 6-БАП 1,0 мг/л (табл. 2).

Таблица 2.

Коэффициент размножения колхицинированных микропобегов яблони на питательной среде QL с добавлением БАП 1,0 мг/л, шт./эксплант

Вариант колхицинирования	Сорт		
	Болотовское	Имрус	Ветеран
<i>колхицин в составе питательной среды</i>			
0,02 % — 24 часа	3,9 ± 0,6	3,9 ± 0,5	—*)
0,02 % — 48 часов	3,7 ± 0,4	—	—
0,02 % — 72 часа	4,7 ± 0,4	1,2 ± 0,4	—
0,01 % — 5 суток	2,3 ± 0,2	2,05 ± 0,2	—
0,02 % — 5 суток	2,1 ± 0,2	2,8 ± 0,2	4,8 ± 0,1

Окончание табл. 2

Вариант колхицинирования	Сорт		
	Болотовское	Имрус	Ветеран
0,01 % — 7 суток	4,0 ±0,7	6,0 ±0,9	2,0 ±0,2
0,02 % — 7 суток	—	2,0 ±0,3	4,5 ±0,8
0,02 % — 9 суток	1,8 ±0,1	2,1 ±0,1	2,3 ±0,2
0,01 % — 10 суток	3,6 ±0,5	—	1,5 ±0,2
0,01 % — 14 суток	3,0 ±0,3	2,2 ±0,3	1,4 ±0,2
0,01 % — 19 суток	3,2 ±0,4	3,1 ±0,4	3,6 ±0,3
<i>капельный способ</i>			
0,1 % — 24 часа	3,0 ±0,3	—	2,3 ±0,3
0,1 % — 48 часов	1,6 ±0,2	—	—
0,2 % — 24 часа	2,7 ±0,3	—	2,0 ±0,1
0,2 % — 48 часов	2,7 ±0,2	—	—

Примечание: *) — отсутствие данных

Какой-либо закономерности в росте микропобегов отмечено не было, однако все они успешно развивались, образуя конгломераты, состоящие из почек и побегов различной длины (рис. 1, 2). Полученные микропобеги при последующих пересадках получают свои номера и ведутся как отдельные клоновые линии. Для получения микропобегов, пригодных для укоренения необходимо провести 3-4 пассажа.

Рис. 1. Конгломераты, образовавшиеся из колхицинированных апексов сортов Ветеран, Имрус, Болотовское (слева направо)

Рис. 2. Микрочеренки сорта Болотовское (0,01 %, 19 суток), пригодные для укоренения

При проведении исследований была выявлена низкая укореняемость микропобегов яблони в питательной среде. Так, у сорта Болотовское этот показатель составил 10 % от всего числа высаженных микрочеренков на питательную среду QL с добавлением ИМК 2,0 мг/л и ГК 0,5 мг/л [9]. На других, использованных нами питательных средах, образования корней не наблюдали. В связи с этим нами был применен способ микропрививки на семенные подвои, выращенные в нестерильных условиях. Приживаемость привитых растений у сорта Болотовское составила 90 %, у сорта Имрус — 87 %. В 2019 г. растения были переданы на цитологический анализ.

Выводы

Индуктирование тетраплоидов сортов яблони как доноров диплоидных нередуцированных гамет с применением биотехнологических методов является перспективным в плане непрерывности этого процесса. При правильно подобранной схеме культивирования длительное воздействие амитотика не оказывает отрицательного влияния на рост и развитие колхицинированных эксплантов. Необходимо также продолжить исследования по использованию капельного способа воздействия.

Список использованной литературы

1. Седов Е. Н., Серова З. М., Янчук Т. В. Обновление сортимента яблони и перспективы дальнейшей селекции во ВНИИСПК // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета, 2018. — № 3. — С. 14–21.
2. 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. (Орел, 1-4 июля 2008 г.). — Орел: ВНИИСПК, 2008. — С. 213–217.

3. Жуковский П. М. Эволюционные аспекты полиплоидии у растений // Полиплоидия и селекция. — Минск, 1972. — С. 9–18.

4. 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.

5. Лизнев В. Н. Полиплоидия в селекции яблони // Плодоовощное хозяйство, 1985. — № 11. — С. 21–23.

6. Джафарова В. Е. Особенности микрклонального развития сортов яблони с геном V_f в связи с вопросами полиплоидии // Селекция и сортоизучение садовых культур. — Орел: ВНИИСПК, 2007. — С. 80–85.

7. Джафарова В. Е. Оценка микроразмножения и индуцирования полиплоидных меристем и форм яблони (*Malus domestica* Borkh.) // Современное садоводство. [Электронный ресурс], 2015. — № 1. Режим доступа: <http://journal.vniispk.ru/pdf/2015/1/13.pdf>.

8. Ташматова Л. В., Высоцкий В. А., Джафарова В. Е. Клональное микроразмножение и депонирование груши *in vitro*: метод. рекоменд. — Орел, 2015. — 18 с.

9. Кухарчик Н. В., Кастрицкая М. С., Семенас С. Э., Колбанова Е. В. и др. Размножение плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro* / Под общ. ред. Н. В. Кухарчик. — Минск: Беларуская навука, 2016. — 208 с.

L. V. Tashmatova, O. V Matsneva, V. V. Shakhov, T.M. Khromova

All-Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, Orel Region, Russia

METHODS OF INDUCING OF APPLE TETRAPLOID FORMS ON THE BASIS OF POLYPLOIDIZATION *IN VITRO*