

ISSN 0558-1125  
УДК 634.11:581.16

**В.Е.ДЖАФАРОВА**, кандидат сельскохозяйственных наук  
Государственное научное учреждение “Всероссийский НИИ селекции плодовых культур”  
(ВНИИСПК), Орел, Россия

**КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ЯБЛОНИ (*MALUS DOMESTICA* BORKH.)  
С ГЕНОМ  $V_f$  И ВОЗМОЖНОСТИ ИНДУЦИРОВАНИЯ ПОЛИПЛОИДНЫХ  
МЕРИСТЕМ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

**V.E.DZHAFAROVA**, PhD  
State Scientific Institution “All Russian Research Institute of Breeding of Fruit Crops”

**APPLE (*MALUS DOMESTICA* BORKH.) CLONAL MICROPROPAGATION WITH THE  
GENE  $V_f$  AND POSSIBILITIES OF THE POLYPLOIDY MERISTEMS INDUCING *IN VITRO***

*Обобщаются особенности двух этапов микроклонального размножения сортов яблони, иммунных к парше: введение меристем в живительную среду и собственно размножение. Их оптимизация позволяет тиражировать сорта в виде почек и побегов (конгломераты). Отбор почек для колхицинирования дал возможность выявить лучшие варианты: адвентивные размером 3-4 и апикальные – до 5 мм. На основании изменения пloidности меристем в результате колхицинирования делается заключение о возможности индуцирования митотических полиплоидных тканей сортов яблони с геном  $V_f$ .*

*The peculiarities of two stages of the scab immune apple varieties microclonal propagation, namely: meristems planting in the media and micropropagation are generalized in the paper. Their optimization enables to copy the cultivars as buds and shoots (conglomerates). The selection of buds for colchicine treatment makes it possible to reveal the best variants: adventive buds at a size of 3-4 mm and apical ones up to 5 mm. On the basis of the meristem ploidy change as a result of the colchicine treatment it has been concluded that there is a possibility of inducing the apple cvs mitotic polyploidy tissues with the gene  $V_f$ .*

**Актуальность исследований.** Эволюция культурных растений на основе полиплоидии обеспечивает их всестороннее улучшение, повышение количества и качества продуктов и веществ, производимых данным видом. В подавляющем большинстве случаев полиплоидные типы в этом отношении оставляют далеко позади себя свои исходные диплоидные формы [1].

В настоящее время большинство культивируемых сортов яблони – это диплоиды ( $2n = 34$ ). Однако из полиплоидов наибольший хозяйственный интерес представляют триплоиды ( $2n = 51$ ). Этот факт обусловлен их биологическими и хозяйственными особенностями. Триплоидные сорта отличаются высокой и регулярной урожайностью по годам [2, 3], отсутствием резко выраженной периодичности плодоношения [4], большой самоплодностью [5] и устойчивостью к болезням [6]. Их плоды по массе [4, 7] и содержанию витамина С [3, 4] превосходят диплоидные.

Триплоидия у яблони, как отмечает Г.А. Бавтуто [8], означает самый низкий уровень полиплоидии, который дает наивысший эффект. Триплоидные сорта в настоящем представлены

такими известными, как Болдуин, Пепин Ньютона, Ренет Кулона, Джонаголд, Витязь, Низкорослое, Мутсу, Спиголд, Зимнее превосходное, Память Семакину, Рождественское, Юбиляр и многими другими.

Тетраплоидные формы ( $2n = 68$ ), как правило, не являются хозяйственно ценными, но вызывают интерес, как исходный материал для селекции. Ведь наиболее эффективным способом массового получения триплоидов с целью последующего отбора среди них новых ценных сортов служат гетероплоидные скрещивания типа  $2x \times 4x$  и  $4x \times 2x$  [9, 10].

Тетраплоидный уровень отмечен как у видов, так и сортов яблони. Уже в 60-е годы прошлого столетия спонтанные тетраплоиды были представлены обширным списком, среди них – клоны сортов Мелба, Спартан, Уэлси, Делишес, Голден Делишес, Папировка и многие другие [11]. Такие формы могут быть получены или выявлены не только в виде спортов известных сортов в результате гибридизации, но и путем химического воздействия на растения.

Наиболее эффективным полиплоидизирующим веществом признан алкалоид колхицин. Обладая меньшей токсичностью и высокой биологической активностью среди полиплоидизирующих веществ, он даже при ничтожных дозах (0,0006%) вызывает нарушения митозов и образование полиплоидных клеток и тканей [12]. Ранние 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. В итоге были созданы колхиплоиды многих плодовых и ягодных культур (яблоня, алыча, абрикос, персик, малина, земляника и другие) [13].

Изучая индуцирование полиплоидов *in vitro* у плодовых культур, ряд авторов [14, 15, 16] отмечает, что воздействие химическими агентами необходимо осуществлять в момент деления наибольшего количества клеток. Известно, что полиплоидия возникает в результате деления хромосом, не сопровождающегося общим делением клетки. Для этих целей больше всего подходит меристема, количественный показатель которой обеспечивается с помощью микроклонального размножения.

Полиплоидия, как метод в селекции, в настоящее время используется практически только во ВНИИСПК Россельхозакадемии, где ведется планомерная крупномасштабная селекционная работа по яблоне. К определенному времени здесь была создана самая большая коллекция полиплоидных форм — доноров диплоидных гамет [18]. Существенным недостатком имеющейся их коллекции являлось и является отсутствие среди них форм, иммунных к парше. Этот недостаток можно исключить подбором второго компонента для гетероплоидных скрещиваний: иммунные сорта или формы. В этом случае из трех геномов один получит триплоидное гибридное потомство от иммунной формы. При наличии иммунных доноров

диплоидных гамет было бы более надежным получение иммунных триплоидных сортов с двойным геномом устойчивости. В силу ряда причин общее количество тетраплоидов, используемых в селекции, в последние годы значительно уменьшилось. Следовательно, проблема, существовавшая ранее – ограниченный набор исходных доноров диплоидных гамет остается и в настоящее время. Необходимо увеличить количество гомогенных тетраплоидных форм и, возможно, диплоидно-тетраплоидных химер. Важно при этом, чтобы второй гистогенный слой апикальных меристем точек роста химер яблони, отвечающий за формирование генетической ткани, был тетраплоидным (подэпидермальный слой 4х). Только в том случае, если подэпидермальный слой тетраплоидный, диплоидно-тетраплоидная химера ведет себя в селекции как настоящий тетраплоид. В гибридном потомстве при скрещивании её с диплоидными сортами образуются триплоидные растения.

Результативность метода полиплоидизации овощных культур [19], который позволяет обеспечить выход полиплоидов на 80-100%, и положительные особенности метода культуры тканей, а также необходимость индуцирования тетраплоидных форм от диплоидных иммунных сортов послужили основанием для разработки метода полиплоидизации *in vitro* меристематических тканей яблони с геном  $V_f$  с целью увеличения выхода тетраплоидных растений, как доноров диплоидных гамет, необходимых для получения триплоидов. Использование полиплоидии с целью получения триплоидных сортов остается важным и несомненно актуальным в селекции яблони.

**Методика исследований.** В начале разработки изучаемого метода необходимо было выявить возможности размножения сортов яблони, иммунных к парше, в условиях *in vitro*.

В исследования были включены четыре сорта: Болотовское, Имрус, Солнышко и Памяти Хитрово – носители гена  $V_f$  (иммунитета к парше).

Этапы микроклонального размножения проводили с применением методов Ф.Л.Калинина, В.В.Сарнацкой и В.Е.Полищук [20].

Для регенерации из эксплантов и размножения микропобегов использовали искусственную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС). Исследования выполнялись только на двух этапах: 1) введение эксплантов в стерильную культуру; 2) собственно микроразмножение. Укоренение микропобегов как этап микроразмножения было исключено в связи с тем, что для полиплоидизации необходимы меристематические ткани.

**Результаты исследований.** Введение меристем яблони в культуру, основанное на однотипных рекомендациях Ф.Л. Калинина, В.В. Сарнацкой, В.Е. Полищук [20], О.А. Леонтьева-Орлова [21], Н.И. Туровской [22], не позволило успешно провести этот этап. Меристемы погибали от недостаточной стерилизации и в большей степени от окисления. Сразу

после их посадки на среду продукты окисления фенолов вызывали пожелтение, а затем некроз ткани. Приживаемость меристем составляла всего лишь 27%. Использование на последней ступени стерилизации антиоксидантной смеси по рекомендации Г.П. Атрощенко с соавторами [23] повысило процент выживания эксплантов до 56.

Однако меристемы, прижившиеся и получившие развитие, в дальнейшем погибали от витрификации. Для повышения результативности этапа введения в культуру испытывались различные стерилизующие агенты и их концентрации, время стерилизации, типы вводимого материала, изменение концентрации аммонийной формы азота.

В качестве стерилизующих агентов были использованы 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). Стерилизацию проводили поэтапно: 1) промывка эксплантов в проточной воде; 2) обработка спиртом (5-7 сек.); 3) промывка стерильной водой в течение 10 мин; 4) обработка стерилизующим агентом на протяжении 5-10 мин; 5) промывка в стерильной воде 3-хкратная (по 10 минут). К стерилизующим агентам добавляли одну каплю твин-20. В среднем процент заражения в зависимости от сорта колебался от 10 до 62, но самый высокий отмечен при обработке смесью белизны с водой (1:4) и 0,01%-м раствором мертиолята в течение 5 мин. Наилучший вариант для стерилизации исходного материала среди испытанных – 0,1%-ый раствор мертиолята на протяжении 10 минут с добавлением капли твин-20.

Введение различных типов исходного материала показало, что лучше всего приживаются микропобеги, простые и этиолированные, высотой 5-7 мм. Приживаемость такого материала составила от 68% у Болотовского до 90 у других испытанных сортов.

Окисление верхушечной культивируемой ткани за счет активирования ферментов, окисляющих фенолы, происходило у всех типов эксплантов (меристема, микропобеги, этиолированные меристема и микропобеги) и у всех сортов, но в разной степени. Гибель меристем от одного только окисления достигала 36,0 - 52,6% в зависимости от сорта, а если суммировать недостаточную степень стерилизации и негативное влияние фенолов – от 63 до 97%.

Известно, что фенольные соединения являются критерием устойчивости растений, т.е. по логике у иммунных сортов их должно быть больше, чем у не иммунных. Учитывая отрицательное влияние фенолов на этапе введения, была выдвинута рабочая гипотеза о прямой зависимости от их количества приживаемости меристем (чем больше их соединений, тем сильнее будет происходить процесс окисления и хуже приживаемость).

Анализ на содержание Р-активных веществ в вегетативных почках яблони показал, что приживаемость меристем зависит не от количества фенолов, а от степени и продолжительности их окисления.

Самое сильное окисление меристем за годы исследований проявлялось у Болотовского, у других сортов оно было слабее. У не иммунного сорта Орловим также отмечен этот процесс, но в очень слабой степени, несмотря на то, что по сумме Р-активных веществ он превосходит Болотовское.

Снять негативное действие фенольных соединений после введения эксплантов в культуру возможно пересадкой их на свежую среду в пределах 5-24 часов с момента введения.

Полное присутствие (по прописи) азотсодержащих солей  $KNO_3$  и  $NH_4NO_3$  вызывало ненормальное разрастание и сильное обводнение тканей, то есть витрификацию. Содержание аммонийной формы азота в МС при введении меристем в культуру в первом и втором пассажах было уменьшено в 4, а начиная с третьего и далее, в 2 раза, хотя пролиферация побегов проходила на той же среде. Доза хелата железа (двойная, тройная) варьировала в зависимости от интенсивности окраски конгломератов. Мезоинозит был полностью исключен из состава среды, так как добавление даже десятой доли вызывало рост каллуса и полное зарастание не только меристем, но и единичных побегов высотой до 8 мм.

Экспланты высаживали на среду с концентрацией 6-бензиламинопурина (6-БАП) 0,5 мг/л и культивировали при температуре плюс 24-26 °С, влажности воздуха 70-75% и освещенности 2,5-3,0 тыс. люкс. Через 7 дней их пересаживали на свежую среду.

Для массового размножения яблони испытывали концентрации БАП 1, 2 и 3 мг/л. При концентрации цитокинина 1 мг/л коэффициент размножения был невелик – 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, Имруса – 2,2, Памяти Хитрово и Солнышка – по 2,0. Однако при концентрации БАП 2 мг/л отмечен рост побегов в длину.

Поиск концентрации гибберелловой кислоты (ГК) с целью элонгации побегов для отработки качественного показателя почек на предмет полиплоидизации не дал результатов. Испытывались концентрации 1, 2, 3, 4, 5 мг на 1 литр среды на фоне БАП 2 мг/л. Снижение концентрации БАП с 2 до 0,5 и 0,3 мг/л без ГК также не способствовало вытягиванию побегов.

Данные, полученные на двух этапах микроразмножения, позволяют говорить о способности иммунных сортов яблони к размножению в условиях *in vitro*.

Для колхичинирования меристем необходимо было определить качественный показатель почек, то есть размер и расположение их в конгломерате. В результате подбора почек, который проводился у сорта Болотовское, из пяти вариантов: 1) почки (аксилярные) в пазухах листьев

размером до 1 мм; 2) почки в пазухах листьев размером 1 мм с кольцом побега шириной 2 мм; 3) почки – 2 мм; 4) адвентивные почки – 3-4 мм; 5) апикальные почки – до 5 мм

по приживаемости после их вычленения и обработки колхицином выгодно отличались адвентивные размером до 3-4 мм, выросшие у основания конгломерата, и апикальные – до 5 мм. Приживаемость таких почек варьировала от 63 до 100%. Аксилярные почки (до 1 мм) погибали через неделю в силу давления на них при вычленении и от некроза. Почки с кольцом побега шириной в 2 мм дали низкий процент приживаемости (10). В дальнейшем целесообразно было использование только адвентивных и апикальных почек.

Колхицином обрабатывали почки сортов Болотовское и Имрус, выросшие *in vitro*, капельным способом (концентрации 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. Обработанные почки после каждой экспозиции промывали стерильной водой.

Важно отметить, что приживаемость промытых почек находилась в пределах 63,3 - 100, без промывания – 10,0 - 23,3 %. Очевидно, процесс промывания позволяет не только устранить последствие полиплоидизирующего агента, но и уменьшить некротизацию обработанных тканей. После колхицинирования почки пересаживали на среду размножения, содержащую БАП в концентрации 2 мг/л среды, где наблюдалось замедленное развитие их до конгломератов, а в последующих пассажах отсутствие вытягивания побегов. Дополнительное внесение в среду 1 мг/л ГК не повлияло на их элонгацию.

За 4 пассажа микроразмножения максимальная высота побегов не превышала 10 мм. В данном случае можно предположить не только ингибирующее действие колхицина на развитие почек, но и недостаточную концентрацию ГК. В последующих пассажах развитие конгломератов проходило в режиме необработанных тканей, то есть увеличивалось образование почек и побегов, а линейный рост последних был в норме.

Цитологические анализы, проведенные сотрудниками лаборатории цитоэмбриологии и генетики ВНИИСПК, выявили изменения ploидности обработанных тканей. При капельном способе обработки точек роста сорта Болотовское колхицином в концентрации 0,2% в режиме 72 часов и Имруса при той же концентрации, но в течение 24 часов отмечены меристемы с триплоидным набором хромосом. С тетраплоидным набором последних получены меристемы сорта Болотовское, обработанные 0,1%-м раствором колхицина и выдержанные 48 часов, а также Имруса при временной экспозиции 72 часа и концентрации 0,2%.

Добавление колхицина в среду в концентрации 0,01% и при экспозиции в 24 часа вызвало изменение ploидности точек роста у сорта Имрус, причем в этом варианте получены и

тетраплоидные, и триплоидные меристемы, но последних было больше. У Болотовского при этой же концентрации, но временной экспозиции 48 часов отмечено наличие химерных тканей. Неравнозначное изменение плоидности меристемных тканей, вероятно, связано с разной их чувствительностью к полиплоидизирующему агенту и диффундированием колхицина в делящиеся клетки или же степенью интенсивности клеточного деления в период воздействия алкалоидом.

Капельный способ обработки меристем предварительно можно считать более производительным, поскольку при нём было выявлено индуцирование большего количества полиплоидных меристем.

**Выводы.** Проведенные исследования свидетельствуют о сложности и в то же время возможности реализации процессов регенерации сортов яблони *in vitro*. Оптимизация условий на этапах введения и микроразмножения позволяет тиражировать меристему изучаемой культуры. Концентрация 6-БАП в среде 2 мг/л определяет оптимальный коэффициент размножения. Для стабильности этого процесса необходимо учитывать все вышеизложенные нюансы.

Возможности индукции полиплоидизации меристематических тканей яблони с геном  $V_f$  в условиях *in vitro* зафиксированы цитологическими исследованиями.

Получение полноценных растений с обязательным цитологическим анализом на плоидность каждого будет заключительным этапом данной разработки в условиях *in vitro*.

### ***Список использованной литературы***

1. Жуковский П.М. Эволюция культурных растений на основе полиплоидии / Полиплоидия и селекция. — М.-Л.: Наука, 1965. — С. 5-17.
2. Туз А.С. Полиплоидия у плодовых культур // Вестник с.-х. науки. — 1965. — №6. — С. 17-21.
3. 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.
4. Исаев С.И., Домрачева И.И. Использование полиплоидии в селекции яблони // Селекция яблони в СССР. — Орел, 1981. — С. 179-185.
5. Haskell G. Man, poliploidy and fruit tree growing in Britain. *Evolution* // N.J. — 1955. — P. 291-301.
6. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Жданов В.В. Состояние и перспективы селекции яблони на полиплоидном уровне // Селекция яблони на улучшение качества плодов. — Орел, 1985. — С. 169-178.
7. Пономаренко В.В. Полиплоидия видов рода *Malus Mill* // Селекция яблони на улучшение качества плодов. — Орел: ВАСХНИЛ, 1985. — С. 163-168.
8. Бавтуто Г.А. Экспериментальная автополиплоидия у яблони (*Malus Mill*) // Тез. докл.: Генетика и селекция растений. — Л., 1977. — С. 39-40.

9. Седов Е.Н. Значение и задачи селекции в улучшении сортимента и интенсификации производства плодов // Селекция и сорторазведение садовых культур. — Орел, 1992. — С. 18-35.
10. Седышева Г.А. Полиплоидия и селекция яблони // Селекция яблони в СССР. — Орел, 1981. — С. 192-198.
11. A Survey of Apple Clones in the United States. — Agricultural Research Service. — US Department of Agriculture. — 1963. — P. 324.
12. Кольцова Н.К. К методике искусственного вызывания полиплоидии колхицином // Докл. АН СССР. Т. 23. — 1939. — №5. — С. 481-484.
13. Nebel B.R. Inducing changes in planets with colchicine shows progress // Fm. Res. N. Y. — 1940. — V. 6. — P. 10-15.
14. Щербаков В.К. Методы экспериментального получения полиплоидов у растений // Тр. МОИП: Полиплоидия у растений. — М., 1962. — Т. V. — С. 110-120.
15. Терновский М.Ф. Преодоление бесплодия у межвидовых гибридов *Nicotiana* // Полиплоидия и селекция. — М. - Л.: Наука, 1965. — С. 70-80.
16. Рыбин В.А. Цитологический метод в селекции плодовых. — М.: Колос, 1967. — 216 с.
17. Марьяхина И.Я., Полумордвинова И.В., Кокорева В.А., Луконина С.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.
18. Седышева Г.А., Седов Е.Н. Эффективность использования полиплоидии в создании адаптивных сортов яблони // Роль сортов и новых технологий в интенсивном садоводстве. — Орел: изд-во ВНИИСПК, 2003. — С. 323-325.
19. Марьяхина И.Я., Полумордвинова И.В., Московкин Л.И., Шевченко Г.С. Полиплоидизация *in vitro* — основа для разработки биотехнологий в селекции лука и чеснока // Тез. докл. V съезда ВОГИС. — 1987. — Т. IV. — Ч. 4. — С. 73-74.
20. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии. — Киев, 1980. — 240 с.
21. Леонтьев-Орлов О.А., Трушечкин В.Г., Высоцкий В.А. Особенности культивирования изолированных апексов яблони *in vitro*. // Плодоводство Нечерноземной полосы. — М., 1988. — С. 21-30.
22. Туровская Н.И. Микроразмножение яблони и груши *in vitro* // Садоводство и виноградарство. — 1994. — №1. — С. 10.
23. Атрощенко Г.П., Самохин Г.М., Орлова С.Ю. Применение антиоксидантов в биотехнологии плодовых и ягодных культур. // Использование биотехнологических методов для решения генетико – селекционных проблем. — Мичуринск, 1998. — С. 25-28.

Одержано редколегією  
16.12.13