

В. Е. Джафарова
Л. В. Голышкин
Е. А. Долматов
Л. В. Ташматова

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ АПОМИКТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ
PYRUS COMMUNIS × CHAENOMELIS JAPONICA В УСЛОВИЯХ IN VITRO

УДК 634.13:581.16

Аннотация

В настоящей статье представлены особенности развития на этапе микроразмножения четырех образцов апомиктических растений, полученных из зародышей от опыления груши пыльцой хеномелеса японского на 55 и 70 дни их развития. Показана различная ответная реакция образцов на испытываемую концентрацию цитокинина (6БАП) и его сочетания с ГК.

Впервые прослежено происхождение корней апомиктических растений на этапе ризогенеза и изучено анатомическое строение корней в условиях *in vitro*. На практике впервые отмечен соматический эмбриогенез, формирующийся из каллусных клеток, образованных на этапе ризогенеза у основания апомиктических микропобегов.

Ключевые слова: апомиктические растения; микроразмножение; корни; соматический эмбриогенез.

V. E. Dzhafarova
L. V. Golyshkin
E. A. Dolmatov
L. V. Tashmatova

SOME FEATURES OF APOMICTIC PLANTS
PYRUS COMMUNIS × CHAENOMELIS JAPONICA IN VITRO CONDITIONS

Abstract

This paper presents the features of development during micropropagation of four samples of apomictic plants derived from embryos after pollination with pollen henamelesa Japanese pear by 55 and 70 days of their development. A different response patterns in the test concentration of cytokinin (6BAP) and in combination with GC.

For the first time traced the origin of apomictic plant roots during rhizogenesis and studied the anatomical structure of roots in the conditions in

vitro. In practice, first noted by somatic embryogenesis, which is formed from the callus cells formed during rhizogenesis at the base of microshoots apomictic.

Key words: apomictic plants, micropropagation, roots, somatic embryogenesis.

Введение

В настоящем ВНИИ селекции плодовых культур активно использует методы биотехнологии при получении апомиктических растений груши. Их применение было обусловлено рядом обстоятельств.

Е.А. Долматовым в 1996 г [3] было выявлено, что при опылении груши пыльцой хеномелеса японского образовывались апомиктические семена, дающие начало диплоидным растениям. Использование генетических маркеров позволило установить, что семена в подобных скрещиваниях развивались из мейотических зародышевых мешков. Это позволило предположить наличие у груши псевдодиплоидного апомиксиса и возможность получения высокогомозиготных растений.

Установлено также, что наряду с нормально развитыми образовалось большое количество щуплых семян. Зародыши в них погибали в поздние сроки и могли иметь гаплоидный набор хромосом [4].

Использование методов биотехнологии позволило изучить все этапы развития апомиктических зародышей до полноценных растений, но в разной степени [2].

На этапе собственно микроразмножения нами было отмечено, что конгломераты №8 из семьи Белорусская поздняя x Хеномелес Японский и №1 из семьи 9.61.65 (Лимонка x Ильинка) x Хеномелес японский в сравнении с другими номерами от пассажа к пассажи состоят из побегов меньшего размера и напоминают «шар». И лишь единичные побеги достигают высоты 15 мм и немного более.

Адаптация апомиктических растений во внешней среде так же остается сложным процессом для отдельных образцов. При использовании общепринятых для микрорастений адаптивных условий (тип субстрата, температура воздуха, освещенность, поддержание влажности субстрата и воздуха) приживаемость их по результатам наших исследований не превышает 50,5%. Наряду с общепринятыми трудностями данного этапа (нарушение деятельности устьичного аппарата и отсутствие корневых волосков) исследователи называют аномальное строение корней растений, образованных *in vitro* [1] и ризогенез в каллусной ткани [5]. В тоже время детальные исследования в этом направлении пока отсутствуют. В связи с этим необходимым является изучение развития

апомиктических растений с целью получения побегов, пригодных к укоренению.

Анализ происхождения корней и их строения в будущем даст корректировку при адаптации апомиктических растений в нестерильных условиях.

Материал и методика

В исследование были включены четыре апомиктических образца: 2 (№12, №8) из семьи Белорусская поздняя x Хеномелес японский и 2 (№1, №5) – из семьи 9.61.65 x Хеномелес японский. Это растения, выросшие из различных зародышей, в возрасте 55...70 дней с момента опыления.

Для изучения степени пролиферации образцов были использованы микропобеги, выросшие *in vitro*. В процессе культивирования учитывали количество почек и микропобегов на эксплант, среднюю длину микропобега. Количественно учитывались микропобеги высотой от 5 мм и более. Все, что было менее 5 мм – относили к разряду почек для упрощения подсчетов. Также учитывали побеги, пригодные для укоренения, ориентируясь на высоту побегов, начиная от 1,5 см, которая в условиях *in vitro* считается оптимальной на этапе ризогенеза [6].

Для культивирования микропобегов использовали питательную среду Мурасиге-Скуга (1962), содержащую БАП в концентрации 1 и 2 мг/л, а также сочетание с ГК, в концентрации 1,5 мг/л.

Фиксацию корней и дальнейшие анатомические исследования проводили по методике З.П.Паушевой (7) с использованием микроскопа Eclipse 80i фирмы Nikon, Япония.

Результаты и их обсуждение

Важной составляющей этапов микроразмножения *in vitro* является эффективное пролиферирование микропобегов.

Анализируя результаты этапа пролиферации апомиктических растений (в течении 4-х пассажей) была отмечена тенденция увеличения коэффициента размножения отдельных номеров при изменении концентрации БАП от 1 мг/л к 2 мг/л или сочетании БАП с ГК. Наибольшей степенью пролиферации из опытных образцов выделялся №8 из семьи Белорусская поздняя x Хеномелес японский (таблица 1).

При концентрации БАП 1 мг/л коэффициент размножения равнялся 3,7. С увеличением концентрации цитокинина до 2 мг/л данный показатель повысился до 4,0. Сочетание цитокинина с ГК в концентрации 1,5 мг/л увеличило коэффициент размножения до 5,3...5,5, а также позволило вытянуть побеги в длину, хотя и незначительно.

В семье 9.61.65 x Хеномелес японский наибольший коэффициент размножения был у №5 и это было характерно для него на среде с

цитокинином в 2 мг/л и его сочетании с ГК. Гибберелловая кислота так же оказала свое действие на вытягивание апомиктических микропобегов №5, где их высота увеличилась на 6...8 мм.

Из изученных образцов только №1 (9.61.65 х Хеномелес японский) имел минимальный коэффициент размножения, значение которого находилось в пределах 1,9...3,3. Но средняя высота побега была больше, чем у других образцов.

Сравнительное изучение номеров по количеству побегов, пригодных для укоренения в зависимости от концентрации цитокинина и его сочетания с ГК дало возможность установить, что с увеличением концентрации цитокинина сокращается количество побегов, пригодных к укоренению. Из таблицы 1 видно, что наилучшие условия для пролиферации побегов создаются в среде, содержащей 1 мг/л БАП и 1,5 мг/л ГК. Если процесс пролиферации проводить постоянно по схеме БАП:ГК=1:1,5, то происходит снижение эффективности этапа микроразмножения. Эту особенность подтверждает отсутствие устойчивого повышения коэффициента размножения от пассажа к пассажи при изучении степени пролиферации апомиктических растений на протяжении 4-х месяцев.

Таблица 1 – Показатели этапа пролиферации апомиктических образцов груши

№	Коэффициент размножения	Среднее количество почек на конгломерат, шт	Средняя высота побегов, мм	Количество побегов, пригодных для укоренения, %
1 БАП				
12	3,0±0,3	1,6±0,2	10,3±2,5	20,9
8	3,7±0,6	3,3±0,3	9,3±2,4	2,9
1	2,6±0,2	1,1±0,2	16,0±3,0	49,8
5	2,6±0,3	1,5±0,2	11,0±2,5	15,6
2 БАП				
12	2,8±0,3	1,6±0,3	9,3±2,2	10,3
8	4,0±0,4	3,3±0,9	7,0±2,0	0,0
1	2,4±0,4	0,9±0,1	11,6±2,4	23,7
5	3,3±0,3	2,4±0,2	8,6±2,1	7,4
1 БАП + 1,5 ГК				
12	3,3±0,4	1,9±0,4	14,3±3,3	45,8
8	5,5±1,0	2,9±0,4	10,6±3,0	15,8
1	1,9±0,2	0,6±0,0	20,0±4,0	71,0
5	2,7±0,3	0,9±0,2	18,6±3,2	58,2
2 БАП + 1,5 ГК				
12	4,1±0,4	3,1±0,3	10,0±2,6	16,8
8	5,3±1,0	3,5±0,6	10,0±3,0	8,4
1	3,3±0,3	2,0±0,4	13,3±3,3	34,7
5	3,8±0,7	2,6±0,5	15,3±2,8	43,3

Анализ конгломератов показал, что короткие побеги, высотой менее 1,5 см составляют от 29 до 100% в зависимости от апомиктического номера. Но при этом было выявлено и то, что в присутствии ГК увеличивалась длина побегов, а значит и их количество, пригодное для этапа ризогенеза.

Для интенсификации размножения апомиктических побегов следует чередовать концентрацию БАП 1 и 2 мг/л через пассаж на фоне 1,5 мг/л ГК. Такое чередование устраняет снижение степени пролиферации и позволяет иметь достаточное количество побегов для этапа ризогенеза.

Пересадка растений регенерантов в почвенный субстрат завершает процесс клонального микроразмножения. Общеизвестно, что после пересадки растений в нестерильные условия из-за нарушения деятельности устьичного аппарата, а также отсутствия образования корневых волосков растения останавливаются в росте, листья опадают и растения погибают. Еще одной причиной гибели растений считают аномальное анатомическое строение корней. В нашем случае важно учесть этот непроверенный факт, в связи с тем, что, во-первых, перед нами стоит задача увеличить выход апомиктических растений, а, во-вторых, в нестерильных условиях выход апомиктических растений пока еще сравнительно мал.

Анатомическими исследованиями было выявлено, что корни апомиктических растений, образованные в условиях *in vitro*, являются по характеристике первичными, как и у растений развивающихся *in vivo*. На рисунке 1 видно, что на поперечном срезе корня легко разграничить две основные структуры: первичную кору и центральный цилиндр. Первичная кора представлена экзодермой, эндодермой и расположенной между ними мезодермой. Центральный цилиндр ясно отграничен и даже обособлен от коры, который содержит в себе первичную флоэмно-ксилемную систему.

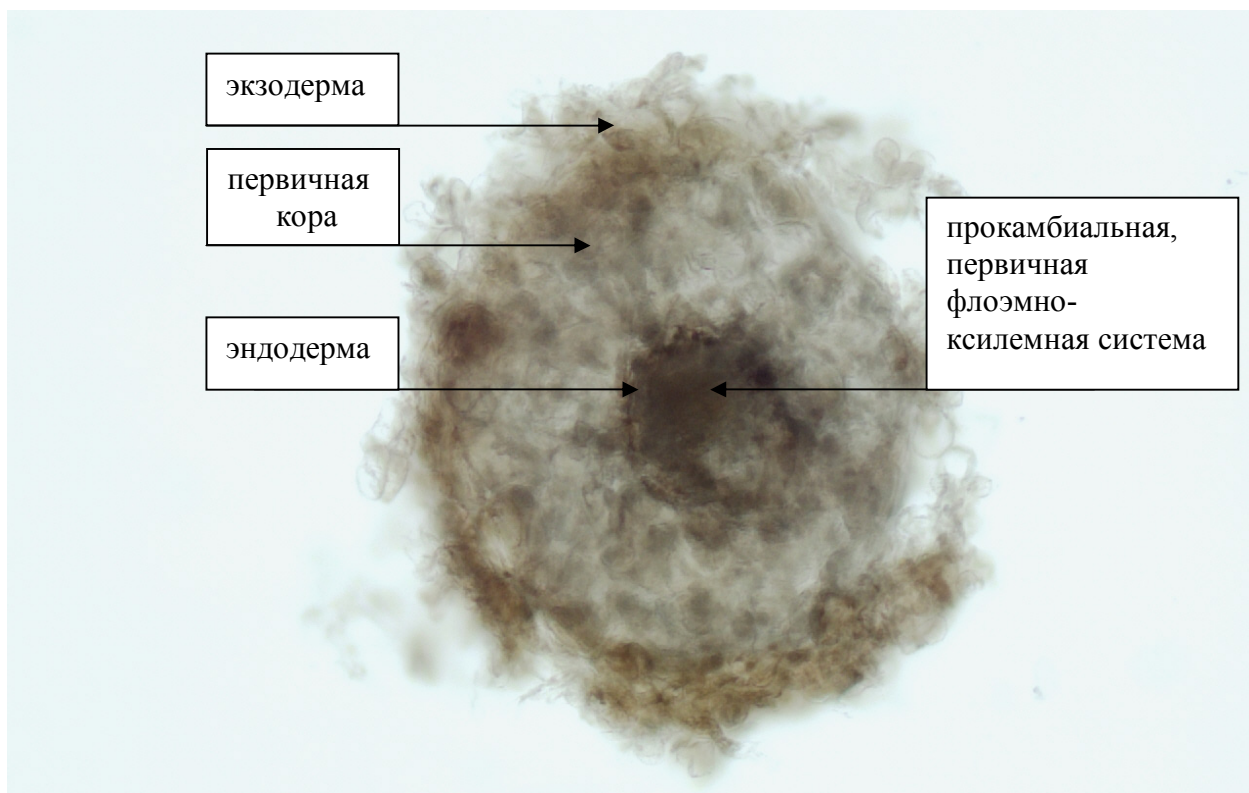


Рисунок 1 – Анатомическое строение корня апомиктического растения №7, выросшего in vitro

Выше отмеченные особенности анатомического строения корней апомиктических растений говорят об отсутствии каких-либо аномалий.

Этап укоренения микропобегов часто сопровождается образованием каллуса. Считается, что корни в таких случаях образуются из каллуса, а не из тканей побега, что препятствует образованию сосудистых соединений между ними. Это в свою очередь определяет степень адаптации микрорастений к нестерильным условиям.

Анатомия поперечных срезов «побег-корень» апомиктических образцов №10 и №7 свидетельствует о том, что корни не каллусного происхождения. Формирование корневых зачатков, их дифференциация и дальнейший рост проходят во внутренних тканях стебля. И в данном случае это не может являться причиной низкой адаптации микрорастений (рисунок 2 а, б).

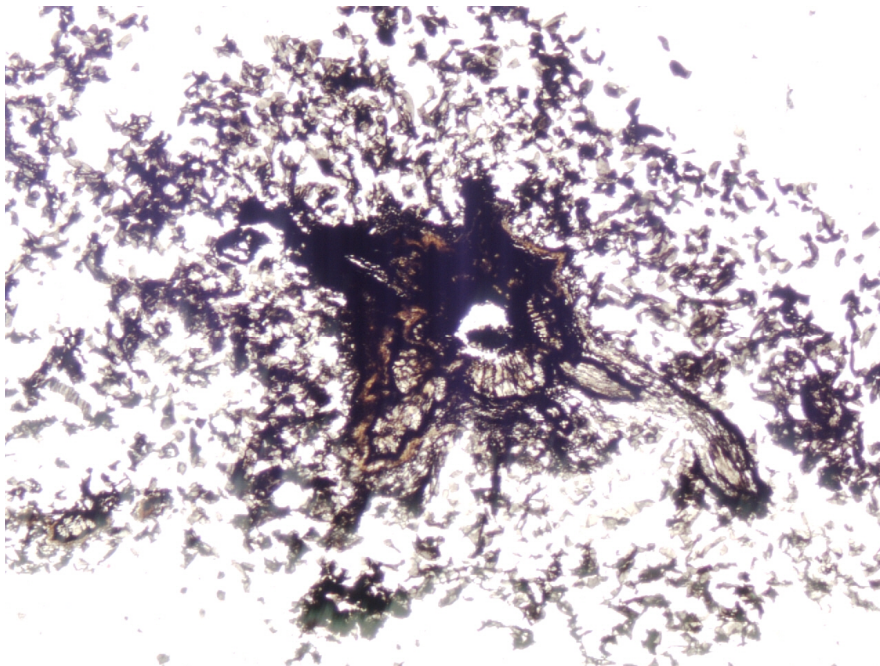


Рисунок 2 а – Поперечный срез «корень – побег» апомиктического образца №10

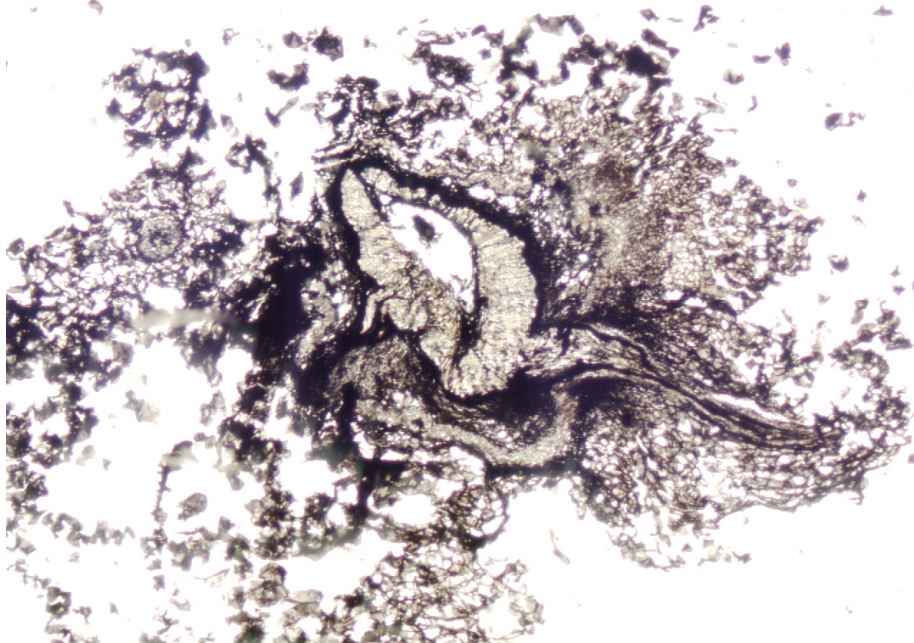


Рисунок 2 б – Поперечный срез “корень - побег” апомиктического образца №7

При просмотре анатомических срезов на предмет происхождения корней у апомиктических образцов на этапе ризогенеза было отмечено образование зародышеподобной структуры в каллусной массе (рисунок 3), которая находится на стадии «сердечка». Это событие отмечено на среде Мурасиге – Скуга для этапа укоренения, где в качестве стимулятора корнеобразования был использован ауксин ИМК в концентрации 0,5 мг/л

среды. В данном случае мы столкнулись с соматическим эмбриогенезом. Обычно эмбриогенные зоны возникают в каллусной ткани, на той питательной среде, которая использовалась для каллусообразования.

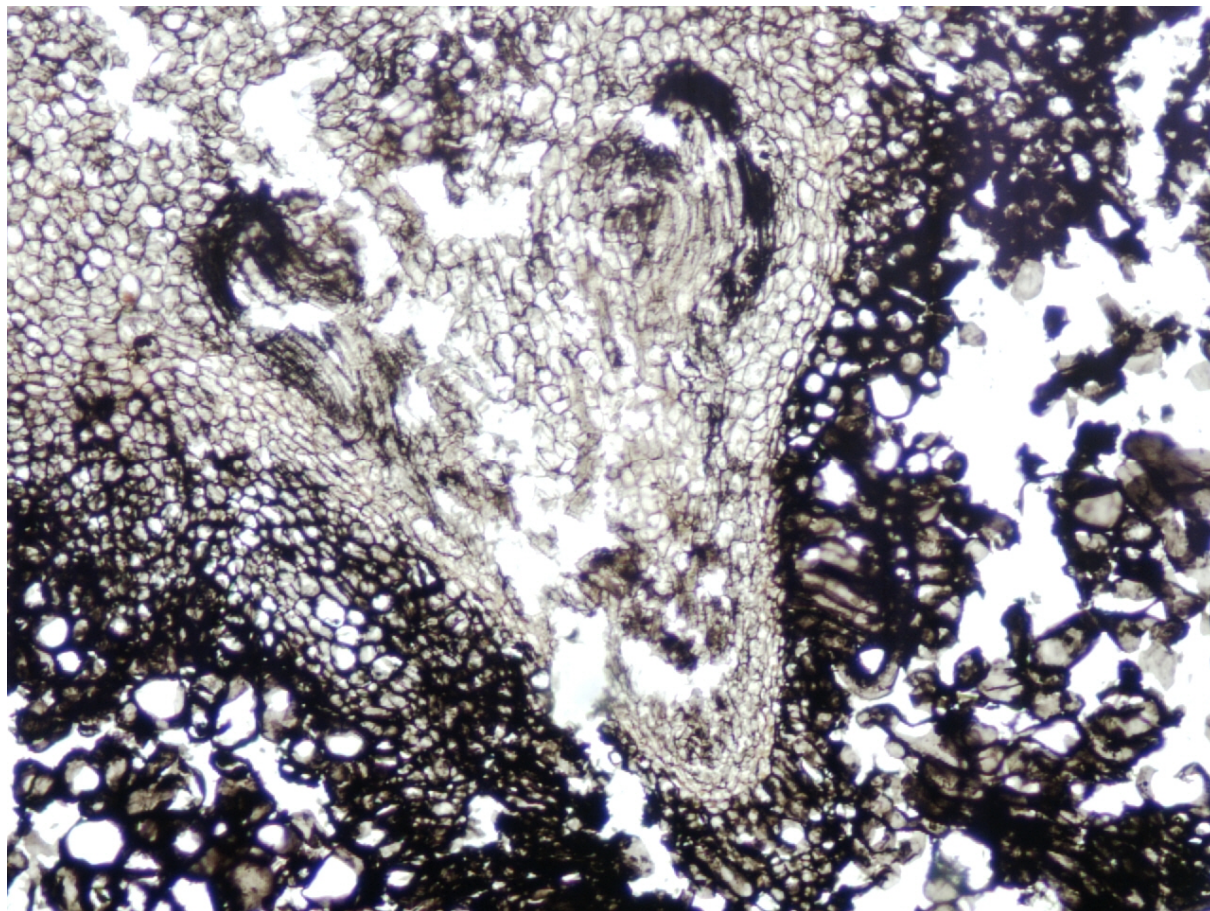


Рисунок 3 – Соматический эмбриогенез в каллусной массе апомиктического образца №5, стадия «сердечка».

Вероятно, в нашем случае каллусообразование стимулировало введение ИМК в среду ризогенеза. Дополнительным стимулом развития эмбриогенеза возможно явилось присутствие в среде нитрата аммония. Соматический эмбриогенез является одним из способов создания новых диплоидных, анеуплоидных и полиплоидных растений. Достаточно лишь найти условия образования и культивирования соматических зародышей.

Выводы

Из результатов проведенных исследований следует, что коэффициент размножения апомиктических образцов увеличивается при изменении концентрации цитокинина от 1 мг/л к 2 мг/л среды. Микроразмножение растений на фоне ГК дает более высокие побеги, тем самым увеличивая количество побегов для этапа ризогенеза.

Анатомическое строение корней апомиктических растений носит первичный характер без каких-либо аномалий.

В процессе исследования в данной комбинации скрещивания установлено редкое явление соматического эмбриогенеза.

Литература

1. Высоцкий В.А., Олешко Е.В. Использование микропрививок при клональном микроразмножении косточковых культур // Сельскохозяйственная биология. – 1988. - №4. – С. 75-77.

2. Джафарова В.Е., Долматов Е.А., Ташматова Л.В. Элементы технологического процесса получения апомиктических растений груши с использованием методов *in vitro* // Методические рекомендации. – Орел. – 2011. – 20 с.

3. Долматов Е.А. Стимулятивный апомиксис и проблема получения гомозиготных растений у груши // Селекция и сорторазведение садовых культур. – Орел: ВНИИСПК, 1996. – С. 111 – 122.

4. Долматов Е.А., Панова Н.И. Апомиксис и экспериментальная гаплоидия у груши // Селекция и сорторазведение садовых культур. – Орел: ВНИИСПК, 1998. – С. 276 – 280.

5. Майорова Ю.А. Оптимизация этапов клонального микроразмножения гибридов вишни на основе применения новых биологически активных веществ: автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. с.-х. наук. – Краснодар, 2009. – 24 с.

6. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Влияние некоторых биологических, морфологических и механических факторов на регенерацию яблони и груши *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. – Москва. – 2011. – Т. XXVI. – С. 63 – 69.

7. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – Москва: ВО «Агропромиздат», 1988. – 271 с.