

УДК 634.13:581.16

В. Е. Джафарова, к.с.-х.н.

ГНУ ВНИИ селекции плодовых культур, г. Орел, Россия, info@vniispk.ru

**ОСОБЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ЭТАПОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АПОМИКТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ
(*PYRUS COMMUNIS L.*) × (*CHAENOMELES JAPONICA [THUNB] LINDL.*) *IN VITRO***

Аннотация

В статье представлены данные научных исследований этапов микроразмножения и ризогенеза апомиктических растений *Pyrus communis* × *Chaenomeles japonica*, а также последующая их адаптация в нестерильных условиях. Показано, что для оптимизации степени пролиферации микропобегов этап микроразмножения следует проводить, чередуя концентрацию цитокинина 6-БАП (6 - бензиламинопурина) 1 мг/л и 2 мг/л на фоне ГК (гибберелловая кислота). Данный прием увеличивает как коэффициент размножения, так и высоту микропобегов. Активная пролиферация побегов, пригодных для этапа ризогенеза начинается со второго пассажа. Этап укоренения результативнее при использовании ИУК.

Описан процесс прививки микропобегов, полученных *in vitro*, на нестерильный подвой, в итоге повышающий выход полноценных растений для дальнейших исследований.

Ключевые слова: апомиктические растения, микроразмножение, прививка.

UDC 634.13:581.16

V. E. Dzhafarova, candidate of agricultural sciences

Russian research institute of horticultural breeding, Orel, Russia, info@vniispk.ru

**CHARACTERISTICS OF SOME PHASES OF APOMICTIC PLANTS
(*PYRUS COMMUNIS L.* × *CHAENOMELES JAPONICA [THUNB] LINDL.*) *CULTIVATION IN VITRO***

Abstract

Phases of micro propagation and rhizogenesis of apomictic plants *Pyrus communis L.* × *Chaenomeles japonica* as well as their following adaptation in non-sterile conditions have been studied. The results are given. It is shown that for the purpose of optimization of the proliferation degree of micro shoots the phase of micro propagation should be carried out with the concentration alternation of cytokinin 6-benzilaminopurine 1 mg/l and 2 mg/l on the background of gibberellic acid. This technique increases both the propagation factor and the height of shoots. An active proliferation of shoots suitable for the rhizogenesis phase begins from the second passage. The rooting phase is more effective when using indole-acetic acid.

The process of inoculation of micro shoots obtained *in vitro* on a non-sterile rootstock is described. As a result this process increases the output of valuable plants for the further investigations.

Key words: apomictic plants, micro propagation, inoculation

Введение

Ранее, проводя исследования по культивированию апомиктических зародышей *Pyrus communis* × *Chaenomeles japonica* на ранних стадиях развития в условиях *in vitro*, были выявлены некоторые отклонения в их развитии. При формировании побега: отсутствие роста, образование этиолированных листочков, разрастание на 2...3 точки роста. При формировании корневой системы: отсутствие роста корня, утолщение корня, нарушение полярности [1]. Количество проростков из 70-дневных зародышей с аномалиями достигало 50% (одновременно с аномалиями побегов и корней). За полтора месяца пребывания на искусственной питательной среде проростки при отсутствии аномалий развивались в миниатюрные растения высотой от 5 до 20 мм, количеством листочков – от 2 до 8 штук и длиной корешков – от 6 до 33 мм.

Если идти по пути один зародыш – одно растение, получить полноценные растения невозможно. При пересадке в нестерильные условия гибель растений достигает 100% [2].

Важной составляющей микроразмножения плодовой культуры в условиях *in vitro* является не только эффективное пролиферирование почек и микропобегов, но и выход побегов длиной свыше 1,5 см. Побеги такого размера в дальнейшем используются для этапа укоренения.

На начальном этапе данная цель была достигнута. Однако, для дальнейших исследований количество апомиктических образцов в форме полноценных растений должно быть несоизмеримо больше. Поэтому исследования по оптимизации последних двух этапов продолжались.

В нашем случае необходимо было сохранить проростки, размножить и получить полноценные растения для дальнейших исследований по получению полностью гомозиготных растений и использованию их в селекционном процессе.

Материал и методика

Исследования проводились по образцам №8, №12 из семьи Белорусская поздняя × Хеномелес японский и по образцам №1 и №5 из семьи 9-61-65 (Лимонка × Ильинка) × Хеномелес японский.

Для изучения процесса пролиферации образцов были использованы микропобеги, выросшие из 55...70-дневных зародышей в условиях *in vitro*. В процессе прослеживали динамику нарастания почек и побегов от первого пассажа к четвертому. К разряду побегов относили только те, которые были высотой 5 и более миллиметров, менее 5 мм – к разряду почек. Отдельно учитывали побеги от 1,5 см, считающиеся оптимальными для этапа ризогенеза [3], а также побеги от 2,0 см, высота которых более удобна для процесса прививки.

Культивирование микропобегов проводили на питательной среде Мурасиге – Скуга (1962) с добавлением 6-БАП в концентрации 1 и 2 мг/л и в сочетании с ГКз в концентрации 1,5 мг/л.

Результаты и их обсуждение

Использование на этапе пролиферации цитокинина 6-БАП показало, что с увеличением его концентрации от 1 до 2 мг/л было отмечено повышение коэффициента размножения отдельных образцов. В семье Белорусская поздняя × Хеномелес японский у №8 степень пролиферации увеличилась от $3,7 \pm 0,6$ до $4,0 \pm 0,4$. В семье 9-61-65 × Хеномелес японский у №5 – от $2,6 \pm 0,3$ до $3,3 \pm 0,3$. У других образцов отмечено снижение степени пролиферации почек и побегов (таблица 1).

Таблица 1 – Развитие апомиктических образцов на этапе пролиферации

№ апомиктического образца	Коэффициент размножения	Средняя высота микропобега, мм	Количество микропобегов, %					
			II пассаж		III пассаж		IV пассаж	
			от 15 до 19 мм	от 20 мм и более	от 15 до 19 мм	от 20 мм и более	от 15 до 19 мм	от 20 мм и более
1 БАП								
12	3,0±0,3	10,3±2,5	10,8	0,0	18,9	8,1	10,0	15,0
8	3,7±0,6	9,3±2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	5,7	2,9
1	2,6±0,2	16,0±3,0	31,6	18,4	20,0	23,3	20,5	34,1
5	2,6±0,3	11,0±2,5	0,0	0,0	9,7	3,2	12,8	23,4
2 БАП								
12	2,8±0,3	9,3±2,2	0,0	0,0	16,7	4,2	3,1	6,2
8	4,0±0,4	7,0±2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	2,4±0,4	11,6±2,4	0,0	0,0	13,8	10,3	29,4	17,6
5	3,3±0,3	8,6±2,1	12,5	0,0	8,0	0,0	14,3	0,0
1 БАП ± 1,5 ГК								
12	3,3±0,4	14,3±3,3	21,2	34,6	36,1	22,2	7,7	15,4
8	5,5±0,1	10,6±3,0	18,8	7,8	4,4	2,9	8,5	5,7
1	1,9±0,2	20,0±4,0	22,2	61,1	21,6	39,2	15,6	53,1
5	2,7±0,3	18,6±3,2	28,6	34,7	11,1	44,4	7,1	45,7
2 БАП ± 1,5 ГК								
12	4,1±0,4	10,0±2,6	3,4	10,3	7,5	2,5	20,0	6,6
8	5,3±1,0	10,0±3,0	3,1	0,0	5,4	0,0	20,0	0,0
1	3,3±0,3	13,3±3,3	20,0	24,0	9,7	16,1	18,5	24,1
5	3,8±0,7	15,3±2,8	13,2	36,8	8,0	20,0	28,6	26,2

Для полного представления процесса пролиферации апомиктических образцов учитывали образование почек и побегов, то есть развитие эксплантов в динамике. Рассматривая нарастание почек и побегов следует отметить, что в первом и втором пассажах в основном преобладало образование почек. Если принять количество побегов за единицу, то соотношение побег : почка в первом пассаже находилось от 1 : 1,2 до 1 : 4,2. Побег, образованный в I пассаже, в основном были 5...6 мм длиной. Во втором пассаже сохранялась тенденция преобладающего образования почек и побегов минимальной высоты, за исключением апомиктического образца №1 при концентрации БАП – 1 мг/л. Активная пролиферация побегов большинства номеров началась с третьего пассажа, где образование побегов оптимальной длины для этапа укоренения колебалось от 8,0 до 43,3%. В четвертом пассаже данный показатель варьировал от 8,6 до 54,6%. У образца №8 при концентрации БАП – 2 мг/л оптимальных для укоренения побегов не образовалось. В массе своей это были побеги от 5 до 10 мм в третьем и от 5 до 13 мм – в четвертом пассажах.

В целом, использование цитокинина БАП на этапе пролиферации апомиктических растений позволяет иметь незначительный процент побегов для укоренения.

Для увеличения выхода побегов для этапа ризогенеза было испытано сочетание БАП и ГК. Включение в состав среды гибберелловой кислоты в концентрации 1,5 мг/л способствовало не только повышению коэффициента размножения, но и вытягиванию побегов. Уже во втором пассаже количество микропобегов от 15 мм и более, то есть пригодных для этапа ризогенеза, колебалось от 26,6 до 83,3% в зависимости от апомиктического образца. Образец №8, имеющий всего лишь 8,6% побегов для укоренения при концентрации БАП – 1 мг/л, при использовании сочетания БАП – 1

мг/л с ГК – 1,5 мг/л проявил активную пролиферацию побегов. В количественном выражении это колебалось от 7,3 до 26,6% в зависимости от пассажа. При сочетании БАП – 2 мг/л с ГК – 1,5 мг/л соответственно от 3,1 до 20,0%.

Если сравнивать все апомиктические образцы на этапе пролиферации, то образцы под номерами 1 и 5 из семьи 9-61-65 × Хеномелес японский отличались большей степенью пролиферации оптимальных по высоте побегов в сравнении с образцами из семьи Белорусская поздняя × Хеномелес японский. Из представленных образцов последней семьи №8 отличался недостаточно высоким выходом оптимальных по высоте побегов. Повышение концентрации ГК до 5 мг/л в сочетании с БАП (1 и 2 мг/л) не дало положительных результатов по данному образцу. Образовавшиеся побеги имели высоту в основном от 5 до 10 мм. Снижение концентрации БАП до 0,2 мг/л позволило получить у №8 побеги более 15 мм всего лишь 6,6%. В целом пролиферация побегов наилучшим образом проходила на среде, содержащей 1 мг/л БАП и 1,5 мг/л ГК. Однако, для устойчивого формирования множественного количества почек и побегов следует чередовать концентрацию БАП (1 и 2 мг/л) на фоне 1,5 мг/л ГК через пассаж. Подобное чередование устраняет резкое снижение степени пролиферации и повышает выход оптимальных по длине побегов для этапа ризогенеза. Этап укоренения, следующий за этапом пролиферации осуществляли с использованием веществ ауксинового ряда, внесенных в состав среды. Использование ИМК в концентрации 0,5 мг/л способствовало незначительному образованию каллуса и укоренению побегов в пределах 43...71%. Введение в среду ИУК в концентрации 1 мг/л повысило укореняемость побегов до 80...87%.

Адаптация укорененных растений в стандартных нестерильных условиях обеспечила их приживаемость всего лишь на 50,5%.

Все отмеченное выше свидетельствует, о том что этап адаптации не обеспечивает высокий выход растений для последующих исследований.

В дальнейшем для повышения результативности последнего этапа микроразмножения был использован прием прививки апомиктических побегов *in vitro* на нестерильный подвой груши обыкновенной.

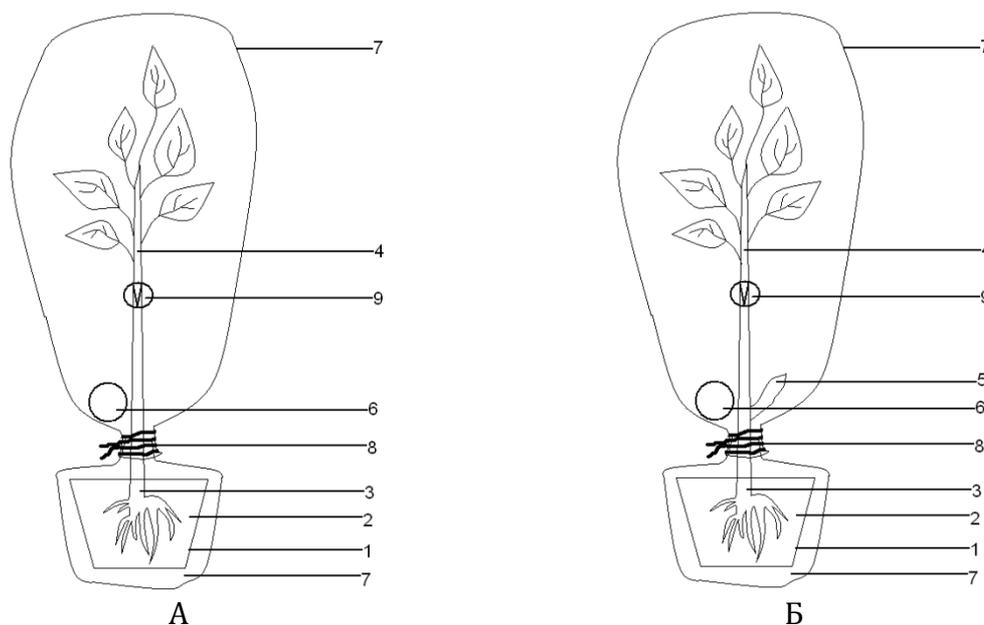
Подвой для прививки выращивали в открытом грунте и в помещении для адаптации растений *in vitro* в субстрате, состоящем из дерновой земли, торфа и песка в соотношении 3 : 1 : 1.

Прививку проводили в период активного роста подвоя на зеленую часть растущего побега. В качестве привоя использовали стерильные побеги, пригодные для этапа ризогенеза и побеги, не образовавшие корней на этапе укоренения, размером не менее 2 см. Из таблицы 1 видно, что использование цитокинина БАП в сочетании с ГК, начиная со второго пассажа, можно получить от 7,8 до 61,1% микропобегов от 20 мм и более, пригодных для прививки.

Прививку проводили в расщеп с обвязкой тонкой пленкой (рисунок 1А). Предварительной обработки срезов привоя и подвоя не делали. Привитые компоненты закрывали полиэтиленовым пакетом, перевязывая нитью вокруг подвоя, с закрытием вазона оставшейся частью пакета. Внутри пакета помещали ватный шарик, увлажненный стерильной дистиллированной водой, диаметром до 1 см.

Период прививки можно продлить. Для этого подвой груши, выращенный в открытом грунте, переносили в условия искусственного помещения с посадкой в вазоны (рисунок 1Б). Прививку проводили в период активного роста. Перед прививкой у подвоя удаляли боковые побеги, при этом оставляли самый нижний, а листья на нем удаляли («ослепляли»). Прививку проводили в расщеп с последующей обвязкой и закрытием пакетом компонентов прививки. Внутри пакета, как и в первом случае,

помещали увлажненный ватный шарик. Через неделю с момента прививки пробуждается спящая почка у оставленного побега и интенсивно развивается побег с листочками. Отрастающий побег за счет функционирования листьев создает определенную влажность для привитых компонентов. Пакет удаляли, как только начинал отрастать новый листок на привое и одновременно удаляли «ослепленный» побег. Готовые растения адаптировали к пониженной влажности воздуха, периодически обрызгивая их водой.



1. Вазон. 2. Субстрат. 3. Подвой. 4. Привой. 5. «Ослепленный» побег подвоя. 6. Увлажненный ватный шарик. 7. Защитный полиэтиленовый пакет. 8. Перевязка пакета. 9. Обвязка.

Рисунок 1 – Прививка микропобегом, полученным методом *in vitro* на нестерильный подвой

В итоге прививка на подвой, пересаженные из открытого грунта в условия искусственного освещения, позволила дополнительно получить 54% полноценных растений, а прививка на подвой, выращенные в условиях искусственного освещения – 80%.

Вышеописанный способ прививки не требует больших трудовых и денежных затрат.

Выводы

Результаты исследований показывают, что процесс пролиферации апомиктических растений более активно проходит при использовании цитокинина 6-БАП в чередовании его концентраций 1 мг/л и 2 мг/л. Совместное использование цитокинина и ГК позволяет уже во втором субкультивировании иметь полноценные микропобеги как для этапа ризогенеза, так и для прививки. Процесс прививки повышает выход количества полноценных растений для дальнейших исследований.

Литература

1. Джафарова В. Е., Долматов Е. А., Ташматова Л. В. Элементы технологического процесса получения апомиктических растений груши с использованием методов *in vitro*: метод. реком. – Орел: ВНИИСПК, 2011. – 20 с.

2. Долматов Е. А., Джафарова В. Е. Апомиксис и проблема получения гаплоидов и гомозиготных диплоидов у груши (*Pyrus communis* L.) // Сортовивчення та охора прав на сорти рослин. – Киев. – 2013. – №1 (18). – С. 22-25.

3. 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.