

УДК 634.11:576.356.5



В. Е. Джафарова, к.с.-х.н.

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

КОЛХИЦИНИРОВАНИЕ ПРОРОСТКОВ ЯБЛОНИ (*MALUS DOMESTICA* BORKH)

Аннотация

В статье представлены результаты колхицинирования проростков яблони (*Malus domestica* Borkh). В исследования включены семена ряда сортов яблони, полученные от свободного опыления. Колхицинирование проростков проводили с целью получения полиплоидных растений. Спектр концентраций колхицина подбирался эмпирически.

Выявлено, что увеличение концентрации колхицина снижает количество жизнеспособных проростков. Вероятно, высокие концентрации колхицина в более сильной степени блокируют митоз в корешках.

Проросшие семена сортов по-разному отзываются на колхицин в силу их неодинаковой чувствительности на данный антимиотический агент.

Процесс посева колхицинированных проростков в условия *in vitro* наглядно показал, что происходило с ними после высева в грунт.

Из 840 обработанных колхицином проростков выросло всего лишь 125 жизнеспособных растений. Из них 16 по морфологическим признакам отнесены к полиплоидам.

Ключевые слова: яблоня, полиплоидия, колхицин, семена, проростки

UDC 634.11:576.356.5

V. E. Dzhafarova, candidate of agricultural sciences

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

COLCHICINE TREATMENT OF GERMINATED SEEDS OF APPLE (*MALUS DOMESTICA* BORKH)

Abstract

The results of colchicine treatment of apple germinated seeds are presented. The seeds of a series of apple cultivars obtained from open pollination were studied. The colchicine treatment of germinated seeds was carried out for the purpose of obtaining polyploidy plants. A spectrum of colchicine concentrations was empirically selected.

It was determined that greater colchicine concentration reduced a number of viable germinated seeds. Probably, high concentrations of colchicine blocked mitosis in rootlets to a greater degree.

Germinated seeds differently responded to colchicine owing to their unequal susceptibility to that antimetabolic agent.

The sowing process of treated germinated seeds *in vitro* clearly demonstrated what happened with them after sowing out into the ground.

Only just 125 viable plants were grown from 840 germinated seeds treated with colchicine. 16 of them were attributed to polyploids according to their morphological traits.

Key words: apple, polyploidy, colchicine, seeds, germinated seeds

Введение

Главной задачей селекции плодовых культур является постоянное совершенствование сортимента. При создании новых высокоадаптивных, зимостойких, скороплодных, высокоурожайных, устойчивых к болезням и вредителям сортов яблони наряду с традиционными методами используется уже зарекомендовавший себя метод полиплоидии. Полиплоидия дает богатейший исходный материал за счет размаха наследственной изменчивости. Самое же существенное состоит в том, что изменения в морфологии и физиологии организмов, внесенные полиплоидией, могут быть наследственно закреплены [2, 4, 14, 16].

Одно из главных направлений селекции яблони, отмеченное ранее Е. Н. Седовым [15] – расширение коллекции тетраплоидов, являющихся исходными формами – донорами диплоидных гамет, и использование этих доноров в валентных скрещиваниях ($4x \times 2x$ и $2x \times 4x$) для массового получения триплоидов с целью последующего отбора среди них хозяйственно ценных форм актуально и в настоящее время.

Селекция яблони на полиплоидном уровне, прошедшая путь с конца тридцатых годов прошлого столетия и до настоящего времени, определила наилучший уровень плоидности у существующих сортов и уровень плоидности, необходимый для подбора родительских пар, с целью создания нового сорта.

По данным Г. А. Бавтуто [3], R. Singh и B. A. Wafai [20], Г. А. Седышевой и Е. Н. Седова [16] триплоидия у яблони – наименьший уровень плоидности, который дает наилучший эффект по совокупности хозяйственно-ценных признаков.

Основная масса индуцированных полиплоидов плодовых и ягодных растений в свое время была получена путем полиплоидизации молодых сеянцев на стадии первых настоящих листочков [13, 10, 11], на основе обработки прорастающих семян, молодых проростков, точек роста, бутонов и черенков [6, 17, 18], то есть методом экспериментальной полиплоидии с использованием химических соединений, действие которых основано на подавлении сократительных функций нитей веретена [12]. Среди антимитотических агентов, используемых для получения полиплоидных форм растений [1, 8, 9] наиболее частое применение находит колхицин, как препарат более эффективный, менее токсичный и обладающий высокой биологической активностью.

По данным Н. К. Кольцова [7] колхицин вызывает нарушения митозов и образование полиплоидных клеток и тканей даже ничтожными дозами (0,0006%).

С практической точки зрения получение индуцированных полиплоидов у сортов, обладающих ценными свойствами, более желательно. Но как замечает В. Н. Лизнев [10] необязательно получение полностью тетраплоидных растений, достаточно иметь диплоидно-тетраплоидные химеры, у которых второй гистогенный слой апикальных меристем точек роста, отвечающих за формирование генетической ткани, был тетраплоидным (подэпидермальный слой $4x$). Химерные растения этого типа способны давать нередуцированную пыльцу и зародышевые мешки.

Экспериментальное получение полиплоидных форм яблони с использованием обработки колхицином проросших семян позволит иметь дополнительные источники – доноры диплоидных гамет для селекции яблони на полиплоидном уровне.

Методика исследований

Для индукции диплоидно-тетраплоидных химер использовали семена яблони от свободного опыления.

Колхицинирование проросших семян проводили с учетом опыта В. Н. Лизнева [10]. Посев колхицинированных проростков проводили в стаканчики $v=200$ мл,

заполненные грунтом, и выставляли в комнату нестерильных условий, предназначенную для адаптации материала *in vitro*.

Посев стерильных проростков, обработанных колхицином, в условиях *in vitro* осуществляли на среду Мурасиге - Скуга [19] без стимуляторов роста (цитокининов).

Рост проростков на искусственной питательной среде проходил в культуральной комнате в общепринятых условиях для культуры *in vitro*.

Результаты исследований

Индукирование полиплоидных форм яблони обработкой проростков 0,5% раствором колхицина показало, что подобная концентрация, рекомендованная ранее рядом исследователей [3, 10], оказалась токсичной для проростков яблони, используемых в нашем рекогносцировочном опыте, где жизнеспособными остались лишь единичные растения [5].

В связи с этим появилась необходимость эмпирического подбора концентраций колхицина. В начале исследований была испытана 0,1% концентрация колхицина (таблица 1, 2).

Таблица 1 – Эффективность обработки проростков яблони 0,1% водным раствором колхицина

Сорт	Вариант обработки	Количество, шт.				
		Проростков			Растений	
		Обработанных	Посеянных	Взошедших	Высаженных в грунт	Прижившихся в грунте
Кандиль орловский	24ч 20°C	20	20	19	14	8
	48ч 20°C	20	20	17	16	11
	24ч 15°C	20	20	20	12	1
	48ч 15°C	20	20	4	0	0
	24ч 20°C (n)*	20	20	16	6	0
	48ч 20°C (n)	20	20	5	0	0
	Без обработки	20	20	8	0	0
Всего		140	140	89	48	20

n* – проростки, плавающие в растворе колхицина.

Таблица 2 – Эффективность обработки проростков яблони 0,1% водным раствором колхицина

Сорт, форма	Вариант обработки	Количество, шт.				
		Проростков			Растений	
		Обработанных	Посеянных	Взошедших	Высаженных в грунт	Прижившихся в грунте
Свежесть	24ч 20°C	20	20	14	2	0
	48ч 20°C	20	20	12	5	0
	24ч 15°C	20	20	5	0	0
	48ч 15°C	20	20	4	0	0
	24ч 20°C (n)*	20	20	0	0	0
	48ч 20°C (n)	20	20	0	0	0
	Без обработки	20	20	0	0	0
3-4-98	24ч 20°C	20	20	1	0	0
	48ч 20°C	20	20	1	0	0
	24ч 15°C	20	20	4	2	1
	48ч 15°C	20	20	0	0	0
Всего		220	220	41	9	1

n* – проростки, плавающие в растворе колхицина.

Анализ развития проростков яблони показал, что у сорта Кандиль орловский проростки оказались более жизнеспособными по всем вариантам обработки колхицином.

Взошедшими проростками мы считали те, у которых над поверхностью земли были развиты два семядольных листа.

Проростки сорта Свежесть и №3-4-98 были менее жизнеспособными после обработки даже такой низкой концентрацией колхицина (0,1%). Следует отметить, что до обработки проросших семян зародыши всех испытуемых образцов визуально были оценены как хорошо выполненные.

На наш взгляд всхожесть семян после обработки колхицином определялась не только концентрацией колхицина. По всей вероятности, и качество самих зародышей повлияло на всхожесть проростком, поскольку в варианте – без обработки колхицином, всхожесть семян сорта Кандиль орловский равнялась 40%, а семена сорта Свежесть вообще не взошли.

Предполагаем также, что у сорта Свежесть и №3-4-98 меристемы корешков более чувствительны к полиплоидизирующему агенту.

Что происходило с колхицинированными проростками после посева их в грунт – частично продемонстрировано на рисунках 1 и 2. и ниже отражено по пунктам:



Рисунок 1



Рисунок 2

- загнивание корешка;
- корешок оставался без признаков роста, а почечка и семядольные листочки сгнивали в чешуе;
- почечка и семядольные листочки над поверхностью земли, покровная чешуя не сброшена;
- семядольные листочки с почечкой над поверхностью земли → отрастание настоящих сильно вытянутых листочков → некроз растения от корня → гибель растения;
- гибель растения в состоянии 3...4 настоящих листочков;
- развитие семядольных листочков над поверхностью земли без поступательного роста корешка;
- семядоли в земле живые, наполовину сброшена покровная чешуя, корешок очень сильно утолщен, рост его отсутствует;
- корешок живой, но семядольные листочки не могут пробиться на поверхность земли;
- семядоли над поверхностью земли, сброшена покровная чешуя, но нет точки роста.

Эти проявления характерны были для всех вариантов обработки проростков независимо от концентрации колхицина, времени его воздействия и температурного режима.

Посев колхицинированных проростков в условиях *in vitro* дал более наглядное представление об их последующем развитии (таблица 3).

Таблица 3 – Рост колхицинированных проростков яблони сорта Свежесть в условиях *in vitro*

Вариант обработки	Количество, шт.			Жизнеспособных растений
	Проростков			
	Обработанных	Посеянных	Взошедших	
0,1% раствор колхицина				
24ч 20°C	20	20	9	0
48ч 20°C	20	20	7	1
24ч 15°C	20	20	8	1
48ч 15°C	20	20	12	8
Всего	80	80	36	10
0,5% раствор колхицина				
24ч 20°C	20	20	4	0
48ч 20°C	20	20	8	0
24ч 15°C	20	20	6	0
48ч 15°C	20	20	3	0
Всего	80	80	21	0
Без обработки	20	20	12	6

Из таблицы 3 видно, что с увеличением концентрации колхицина количество взошедших проростков значительно уменьшается. Если при использовании 0,1% концентрации колхицина взошло 45,0% проростков от общего количества обработанных, то при обработке 0,5% раствором – всего лишь 26,2%. В итоге, лишь при использовании 0,1% колхицина было получено 12,5% жизнеспособных растений.

Гибель проростков, обработанных 0,5% колхицином, на среде М-С начиналась уже через 10 дней с некроза корней, который затем переходил на семядольные листочки, а затем на почку или настоящие листья (рисунок 3).



Рисунок 3

При использовании 0,1% концентрации колхицина в условиях *in vitro* от 35 до 60%, в зависимости от варианта, проростки сбросили покровную чешую. Далее в процессе роста наблюдалось заражение среды, поэтому и выход жизнеспособных

растений оказался всего лишь на уровне 12,5%.

Обработка в условиях *in vivo* проростков яблони сортов Созвездие и Орлик 0,1%; 0,2% и 0,3% концентрациями колхицина показала, что чем выше концентрация колхицина, тем меньше остается жизнеспособных растений.

На начальном этапе идентификацию полиплоидов осуществляли по внешним признакам, то есть по морфологическим изменениям, характерным для полиплоидов. Из 840 обработанных проростков жизнеспособными оказались всего лишь 125. Из них 16 по морфологическим признакам представляют интерес как полиплоиды. В дальнейшем цитологический анализ даст оценку растениям по пloidности и их пригодности для селекции.

Выводы

Предварительно по представленным вариантам обработки проростков яблони можно сказать, что чем выше концентрация колхицина, тем меньше жизнеспособных проростков. Использование температурных режимов и временных экспозиций пока не дало четкой картины лучшего варианта, оценивающего растения по морфологическим признакам как полиплоиды.

Идентифицированные по морфологическим признакам полиплоиды отнесены к образцам, полученным от колхицинирования проростков сорта Орлик.

Литература

1. Азарова, А.Б. Подбор условий для получения полиплоидных форм лесных лиственных пород в культуре *in vitro* / А.Б. Азарова, В.Г. Лебедев, О.Ю. Баранов, В.Е. Падутов, К.А. Шестибратов // Клеточная биология и биотехнология растений, - 2013. - Режим доступа: <http://elib.bsu.by./handle/123456789/34911>.

2. Баранов, П. А. Значение полиплоидии в экспериментальной ботанике / П. А. Баранов, Т. С. Матвеева // Полиплоидия у растений.-М.,1962.-Т.V.-С.11-20.

3. Бавтуто, Г. А. Создание исходного селекционного материала яблони методом индуцированной полиплоидии / Г. А. Бавтуто // Селекция яблони в СССР.-1981.-С.186-191.

4. Бреславец, Л. П. Значение полиплоидии в изменении признаков у растений / Л. П. Бреславец // Полиплоидия у растений. М., 1962. - Т. V. - С. 21-32.

5. Джафарова, В.Е. Оценка микроразмножения и индуцирования полиплоидных меристем и форм яблони (*Malus domestica* Borkh) / В.Е. Джафарова // Современное садоводство [Электронный ресурс], - 2015, - №1. - С. 93-99. - Режим доступа: <http://journal.vniispk.ru>

6. Еремин, Г. В. Использование индуцированных полиплоидов косточковых плодовых растений как исходный материал для селекции / Г. В. Еремин, В. В. Ковалева // Отдаленная гибридизация и полиплоидия в селекции плодовых и ягодных культур. - Орел.-1993.-С.19.

7. Кольцов, Н.К. К методике искусственного вызывания полиплоидии колхицином / Н.К. Кольцов // Докл. АН СССР, 1939. - Т.23. - №5. - С 481-484.

8. Копань, В.П. Олигогенная селекция – путь целенаправленного решения селекционных программ в плододовстве / В.П. Копань, К.Н. Копань, А.Н. Ярещенко, Ю.Б. Козулина, С.И. Гребенюк, В.И. Корховой // Роль сортов и новых технологий в интенсивном садоводстве. - Орел, 2003. - С.167-169.

9. Корховий, В.І. Отримання трансгенних рослин яблуні шляхом генетичної трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*: Автореф. дисер. канд. біол. наук: 03.00.15/В.І. Корховий. - Київ, 2005. - 22с.

10. Лизнев, В. Н. Экспериментальная полиплоидия у яблони / В. Н. Лизнев // Тр. Новосибирской плодово-ягодной опытной станции им. И. В. Мичурина. - Новосибирск.-1975.-В.2.-С.3-9.
11. Лизнев, В. Н. Создание индуцированных тетраплоидов и селекция яблони на полиплоидном уровне / В. Н. Лизнев // Селекция яблони на улучшение качества плодов. - Орел.-1985.-С.179-184.
12. Рыбин, В. А. Цитологический метод в селекции плодовых / В. А. Рыбин. М: Колос.-1967.-216 с.
13. Санкин, Л. С. Тетраплоидные формы крыжовника /Л. С. Санкин, Т. П. Фирсова // Цитология и генетика культурных растений. – Новосибирск «Наука».-1967.-С.76-80.
14. Седов, Е. Н. Роль полиплоидии в селекции яблони /Е. Н. Седов, Г. А. Седышева. - Тула.-1985.-146 с.
15. Седов, Е.Н. Главные направления селекции яблони / Е.Н. Седов // Плодоовощное хозяйство. – ВО «Агропромиздат», 1985. - №1. – С.40-42.
16. Седышева, Г. А. Полиплоидия и селекция яблони / Г. А. Седышева, Е. Н. Седов. Орел: ВНИИСПК, 1994.-272с.
17. Чувашина, П. Н. Изучение индуцированных полиплоидов смородины / П. Н. Чувашина // Тр. ЦГЛ им. И. В. Мичурина.-Мичуринск.-1971.-Т. 12.-С.156-172.
18. Щербаков, В. К. Методы экспериментального получения полиплоидов у растений / В. К. Щербаков // Тр. МОИП: Полиплоидия у растений.-Москва.-1962.-Т. v.-С.110-120.
19. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – V.15. – N13. – P. 473-497.
20. Singh R. Intravarietal polyploidy in the apple (*Malus pumila* Mill.) cultivar Hazratbali / R. Singh, B. A. Wafai // *Euphytica.* – 1984. – V. 33. – №. 1. – P. 209-214.

References

1. Azarova A.B., Lebedev V.G., Baranov O.Yu., Padutov V.E., Shestibratov K.A. (2013): Selection of conditions for obtaining polyploid forms of forest leaf-bearing species *in vitro*. In: Proc. Int. Conf. Cell biology and biotechnology of plants. Minsk, The Belarusian State University, Feb. 12-13 2013. Available at: elib.bsu.by/handle/123456789/34911. (in Russian).
2. Baranov P.A., Matveeva T.S. (1962): Polyploidy importance in experimental botany. In: Polyploidy in plants. Moscow, AN SSSR: 11-20. (in Russian).
3. Bavtuto G.A. (1981): Creation of initial breeding apple material by means of induced polyploidy. In: Apple breeding in the USSR. Orel, NIISPK: 186-191. (in Russian).
4. Breslavets L.P. (1962): Polyploidy importance in changing traits in plants. In: Polyploidy in plants. Moscow, AN SSSR: 21-32. (in Russian).
5. Dzafarova V.E. (2015): Estimation of propagation and inducing of polyploidy meristem and selections of *Malus domestica* Borkh. *Sovremennoe sadovodstvo – Contemporary horticulture*, 1: 93-99. Available at: <http://journal.vniispk.ru/pdf/2015/1/13.pdf>. (in Russian).
6. Eremin G.V., Kovaleva V.V. (1993): Use of induced polyploids of fruit stone plants as an initial material for breeding. In: Remote hybridization and polyploidy in fruit and berry breeding. Orel, VNIISPK: 19. (in Russian).
7. Koltsov N.K. (1939): Approaching to methods of artificial rousing of polyploidy by colchicines. *Doklady Akademii Nauk SSSR (Proceedings of the USSR Academy of Sciences)*, 23(5): 481-484. (in Russian).

8. Kopan V.P., Kopan K.N., Yareshchenko A.N., Kozulina Yu.B., Grebenyuk S.I., Korkhovoi V.I. (2003): Oligogenic breeding is a way of purposeful solving of breeding programs in fruit-growing. In: A role of varieties and new technologies in the intensive horticulture. Orel, VNIISPK: 167-169. (in Russian).
9. Korkhovii V.I. (2005): Obtaining transgenic apple plants by genetic transformation using *Agrobacterium tumefaciens* [Biol. Sci. Cand. Thesis]. Kiev, Institute of Cell Biology and Genetic Engineering. (in Ukrainian).
10. Liznev V.N. (1975): Experimental polyploidy in apple. In: Proc. I.V. Michurin Novosibirsk Zonal Fruit and Small Fruit Experimental Station. Novosibirsk, **2**: 3-9. (in Russian).
11. Liznev V.N. (1985): Creation of induced tetraploids and apple breeding on a polyploidy level. In: Apple breeding for fruit quality improvement. Orel, NIISPK: 179-184. (in Russian).
12. Rybin V.A. (1967): Cytological method in fruit breeding. Moscow, Kolos. (in Russian).
13. Sankin L.S., Firsova T.P. Tetraploid genotypes of gooseberry. In: Cytology and genetics of cultivated plants. Novosibirsk, Nauka: 76-80. (in Russian).
14. Sedov E.N., Sedysheva G.A. (1985): A role of polyploidy in apple breeding. Tula, Priokskoe knizhnoe izdatelstvo. (in Russian).
15. Sedov E.N. Major trends of apple breeding. *Plodoovoshchnoe khozyaistvo*, 1: 40-42. (in Russian).
16. Sedysheva G.A., Sedov E.N. (1994): Polyploidy and apple breeding. Orel, VNIISPK. (in Russian).
17. Chuvashina P.N. (1971): Study of induced currant polyploids. *Trudy CGL im. I. V. Michurina (Proceedings of I.V. Michurina Central Genetic Laboratory)*, **12**: 156-172. (in Russian).
18. Shcherbakov V.K. (1962): Methods of the experimental obtaining of polyploids in plants. In: Proceedings of MOIP: Polyploidy in plants, **5**: 110-120. (in Russian).
19. Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**(13): 473-497.
20. Singh, R., & Wafai, B. A. (1984): Intravarietal polyploidy in the apple (*Malus pumila* Mill.) cultivar Hazratbali. *Euphytica*, **33**(1): 209-214. DOI: 10.1007/BF00022767