

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ С ГЕНОМ Vf

Л.В. Ташматова , к.с.-х.н.

О.В. Мацнева, н.с.

В.В. Шахов, аспирант

Т.М. Хромова, м.н.с.

ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, tashmatova@vniispk.ru

Аннотация

Перспективным методом размножения посадочного материала сортов, обладающих ценными свойствами, является клональное микроразмножение. На этот процесс большое влияние оказывают такие факторы как генотип, состояние экспланта, особенности введения экспланта в стерильную культуру, условия культивирования. И это влияние можно видеть на всех этапах культивирования. Поэтому целью наших исследований являлось отработка режимов стерилизации растительного материала на этапе введения в культуру *in vitro* яблони с геном Vf для увеличения выхода стерильных эксплантов и изучение влияния 6-БАП на коэффициент размножения на этапе пролиферации. Объекты исследования сорта яблони: Болотовское, Имрус, Кандиль орловский и Орловское полесье. Изучение влияния сроков введения на развитие эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro* показало, что наиболее благоприятным для яблони является период активного роста – июнь. При изучении стерилизующих агентов было выявлено, что стерилизующий эффект сулемы и мертиолята по периодам введения в культуру был одинаков. В фазе начала роста инфицированность была достаточно высокой у всех сортов кроме Имруса и могла составлять более 50%, не зависимо от типа стерилизующего агента. В фазе активного роста максимальная зараженность составляла 5,1% у сорта Болотовское. Максимальный выход эксплантов – 90% у сорта Кандиль орловский. Экспланты культивировали на питательной среде QL на фоне БАП 0,5 мг/л в течение трех недель. Затем они были пересажены на питательную среду, содержащую БАП в концентрации 0,8 мг/л. На этапе микроразмножения использование БАП в концентрации 1,0 мг/л и 2,0 мг/л. Концентрация БАП 1,0 мг/л способствует образованию микропобегов, пригодных для укоренения, а концентрация 2,0 мг/л – увеличению коэффициента размножения.

Ключевые слова: яблоня; клональное микроразмножение; контаминация; цитокинин; питательная среда; коэффициент размножения

CLONAL MICROPROPAGATION OF APPLE VARIETIES WITH V_F GENE

L.V. Tashmatova , cand. agr. sci.

O.V. Matzneva, researcher

V.V. Shakhov, postgraduate student

T.M. Khromova, junior researcher

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPK, tashmatova@vniispk.ru

Abstract

Clonal micropropagation is promising method of reproduction of improved planting material varieties with valuable properties. This process is greatly influenced by factors such as genotype, explant condition, conditions of the introduction of the explant into the sterile culture, conditions of cultivation. And this influence can be seen at all stages of cultivation. Therefore, the aim of our research are to improve the sterilization regimes of plant material at the stage of introduction into the culture in vitro apple with the gene (V_f) to increase the yield of sterile explants and to study the effect of 6-BAP on the reproduction rate at the stage of proliferation. The objects of study: apple's varieties Bolotovskoe, Imrus Kandil Orlovsky and Orlovskoe Polesye. The study of the influence of the timing of introduction on the development of explants at the stage of introduction into the culture in vitro showed that the period of active growth – June is the most favorable for apple. In the study of sterilizing agents, it was revealed that the sterilizing effect of sulema and mertiolate for the periods of introduction into the culture was the same. In the phase of the beginning of growth, the infection rate was quite high in all varieties except Imrus and could be more than 50%, regardless of the type of sterilizing agent. In the phase of active growth, the maximum infection rate was 5.1% in Bolotovskoe variety. The maximum yield of explants is 90% in the Kandil Orlovsky variety. Explants were cultured on QL nutrient medium on the background of BAP 0.5 mg / l for three weeks. They were then transplanted to a culture medium containing BAP at a concentration of 0.8 mg/l. At the stage of micropropagation, BAP at a concentration of 1.0 mg/l and 2.0 mg/l was used. BAP concentration of 1.0 mg/l contributes to the formation of micro-shoots suitable for rooting, and a concentration of 2.0 mg/l – increase the reproduction rate.

Key words: apple, clonal micro propagation, contamination, cytokine, nutrient medium, multiplication factor

Введение

В условиях интенсификации садоводства, ухудшения экологической обстановки и накоплении болезней и вредителей все большее значение приобретает разработка эффективных технологий внедрения и размножения сортов, обладающих устойчивостью к неблагоприятным факторам. Технология клонального микроразмножения является наиболее перспективной, так как позволяет в полной мере реализовать потенциал растений к размножению.

Известно, что в средней полосе России от поражения паршой снижение урожая яблок составляет 40%, а в отдельные годы достигает 70...80%. (Седов и др., 2014). Поэтому

оптимизация этапов клонального микроразмножения сортов яблони с геном V_f позволит получить за короткое время адаптированные растения-регенеранты в большом объеме.

Размножение растений в культуре *in vitro* проходит следующие этапы: введение в культуру, собственно микроразмножение, элонгация (при необходимости), укоренение, адаптация к нестерильным условиям.

На успех клонального микроразмножения оказывают влияние такие факторы: генотип, состояние экспланта, особенности введения экспланта в стерильную культуру, условия культивирования (Матушкина, 2008).

На этапе введения необходимо подобрать оптимальный срок введения, стерилизующий агент и питательную среду (Джигадло и др., 2005). Часто при введении растений в культуру наблюдается окисление питательной среды токсическими веществами (фенолами), которые замедляют рост экспланта, либо приводят к гибели. Продукты окисления фенолов выделяются в среду в результате травмы при изолировании. Для яблони этот вопрос особенно актуален. Для снятия отрицательного воздействия фенолов растительные ткани обрабатывают антиоксидантными веществами – 0,2% раствором сульфата натрия с аскорбиновой кислотой(1:1), 0,5% раствором ДИЕКА (Ташматова и др., 2018).

Ткани растений заражены грибами и их спорами, а также бактериями, поэтому перед введением необходимо провести их обработку стерилизующими веществами. Для стерилизации эксплантов яблони часто рекомендуют использовать 0,1% раствор диацета, 6% раствор гипохлорида кальция, 12 и 30% перекиси водорода, раствор «Белизны», разбавленный в 3 раза (Шевелуха, 1998, Фролова, 2011, Кухарчик и др., 2016).

Основной целью этапа пролиферации является получение большого количества дополнительных побегов. Достичь этой цели можно за счет высокого коэффициента размножения. Чем выше коэффициент размножения, тем меньше время требуется для получения нужного количества микропобегов и тем выше эффективность данного метода (Бьядовский, 2013).

Повышение коэффициента размножения происходит в результате снятия апикального доминирования за счет удаления верхушки и микрочеренкования или применения цитокининов (Катаева, Бутенко, 1983).

Применение 6-бензиламинопурина (6-БАП) на этапе пролиферации в различной концентрации позволяет увеличить образование числа боковых побегов. Для клоновых подвоев яблони наиболее рекомендованными концентрациями 6-БАП 2,0...3,0 мг/л (Матушкина, 2008), а для сортов – 0,5...1,0 мг/л (Ван –Ункан, 2016).

У яблони достаточно хорошо изучены подвойные формы, в то время как у сортов мы часто сталкиваемся с генотипической реакцией на условия культивирования (Матушкина, 2016). Поэтому целью наших исследований являлось отработка режимов стерилизации растительного материала на этапе введения в культуру *in vitro* яблони с геном V_f для увеличения выхода стерильных эксплантов и изучение влияния 6-БАП на коэффициент размножения на этапе пролиферации.

Материалы и методика исследований

Исследования проводили в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК в 2018...2019 гг. Объектами исследования служили иммунные сорта яблони – Болотовское, Имрус, Орловское полесье, Кандиль орловский. Материал был предоставлен сотрудниками лабораторий селекции и сортоизучения семечковых культур. Меристемы вводили в культуру в период выхода из состояния покоя (апрель) и в период активного роста (июнь).

Исследования проводили по методике, разработанной в ФГБНУ «ВНИИС им. И. В.

Мичурина (2003), рекомендаций О.В. Матушкиной и И.Н. Прониной (2008) и рекомендаций Н.В. Кухарчик (2016).

Для стерилизации использовали 0,1% растворы сулемы и мертиолята. Время воздействия 10 минут. Культивирование эксплантов и микрочеренков проводили на стандартной питательной среде QL с добавлением 6-БАП 08, 1,0 и 2,0 мг/л. Для введения в культуру *in vitro* использовали как апикальные, так и латеральные почки с побегов находящихся в покое растений, а так же верхушки побегов в период активного роста. Длительность нулевого пассажа – 3 недели, длительность промежуточного пассажа (концентрация БАП 0,8 мг/л) и последующих пассажей на этапе размножения – 4 недели.

Культивирование эксплантов проводили в условиях культуральной комнаты при 16 часовом световом режиме, температуре 20...23°C. Освещенность – 2,5 тыс. люкс.

Математическая обработка данных проводили по рекомендации В.А. Потапова.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что стерилизующий эффект сулемы и мертиолята по периодам введения в культуру был одинаков.

В фазе начала роста инфицированность меристем яблони была достаточно высокой у всех сортов кроме Имруса и могла составлять более 50%, не зависимо от типа стерилизующего агента. Получение таких результатов можно объяснить слабым стерилизующим эффектом веществ, вследствие плохого проникновения их в почку (таблица 1).

Таблица 1 – Контаминация меристем яблони в различные периоды введения в культуру *in vitro* в зависимости от стерилизующего агента, %

Сорт	Апрель		Июнь	
	Сулема	Мертиолят	Сулема	Мертиолят
Кандиль орловский	42,0	44,1	1,3	2,1
Орловское полесье	56,7	55,3	1,0	1,1
Болотовское	51,4	50,0	5,1	2,1
Имрус	13,4	21,1	0	1,1

В результате высокой контаминации в нулевом пассаже максимальный выход стерильных эксплантов в весенний период составил 55,2% у сорта Кандиль орловский (таблица 2).

Таблица 2 – Выход жизнеспособных эксплантов сортов яблони в различные периоды введения в культуру *in vitro* в зависимости от стерилизующего агента, %

Сорт	Апрель		Июнь	
	Сулема	Мертиолят	Сулема	Мертиолят
Кандиль орловский	55,2	53,1	88,05	90,1
Орловское полесье	36,0	27,0	88,5	87,8
Болотовское	42,6	39,6	83,4	68,5
Имрус	50,7	38,3	74,4	75,0

При культивировании в течение первого и второго пассажа большая доля эксплантов у всех сортов погибла от некроза. Возможно это связано с тем, что почки не полностью вышли из состояния зимнего покоя.

При введении в фазу активного роста был отмечен высокий выход жизнеспособных

стерильных апексов, которые быстро трогались в рост, и через три недели образовывали розетки листьев (рисунок 1).



Рисунок 1 – Развитие эксплантов яблони сорта Кандиль орловский через 3 недели после введения в культуру (нулевой пассаж)

Предыдущие наши исследования показали, что резкое увеличение концентрации 6-БАП до 1,0 мг/л на этапе размножения у этих сортов вызывало некроз тканей и гибель эксплантов. Поэтому после нулевого пассажа через 3 недели развившиеся меристемы пересадили на питательную среду QL, добавив в ее состав 0,8 мг/л 6-БАП. Данный пассаж является промежуточным между этапом введения и размножения и можно использовать 1 раз. Коэффициент размножения на этом случае был равен 1,0, однако отмечали развитие побега с боковыми почками (рисунок 2).

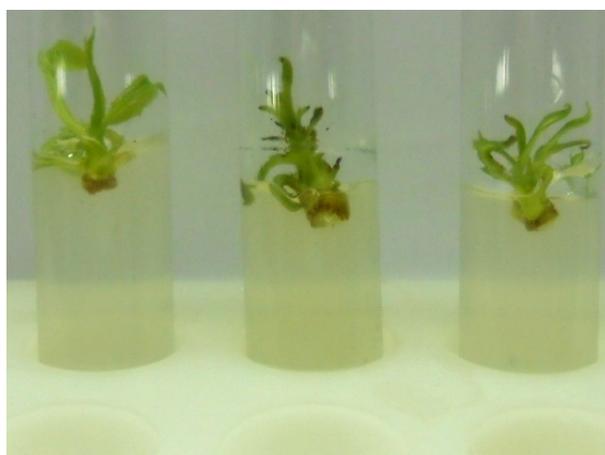


Рисунок 2 – Развитие эксплантов яблони сорта Кандиль орловский на фоне 6-БАП 0,8 мг/л (промежуточный пассаж)

На этапе размножения мы использовали 6-БАП в концентрациях 1,0 и 2,0 мг/л. У образовавшихся микропобегов всех испытанных сортов во всех вариантах опыта были получены дополнительные побеги.

По коэффициенту размножения была установлена индивидуальная реакция генотипов на концентрацию цитокинина (таблица 3).

У всех испытанных сортов мы наблюдали постепенное повышение коэффициента размножения на среде с 6-БАП 1,0 мг/л и снижение этого показателя при 2,0 мг/л.

Таблица 3 – Коэффициент размножения эксплантов яблони на этапе микроразмножения на фоне различных концентраций 6-БАП.

Сорт	БАП 1,0мг/л				Среднее значение
	I пассаж	II пассаж	III пассаж	IV пассаж	
Кандиль орловский	1,5±0,2	2,1±0,3	2,8±0,4	5,1±0,9	2,9±0,4
Орловское полесье	1,9±0,1	2,3±0,1	3,0±0,4	6,2±0,3	3,3±0,2
Болотовское	1,7±0,1	2,4±0,1	2,8±0,1	5,1±0,8	3,0±0,3
Имрус	1,4±0,1	2,1±0,1	2,2±0,2	3,2±0,5	2,2±0,2
6-БАП 2,0мг/л					
Кандиль орловский	4,7±0,4	3,1±0,2	3,7±0,3	3,3±0,2	3,7±0,3
Орловское полесье	3,2±0,3	2,6±0,2	3,1±0,2	2,6±0,2	2,9±0,2
Болотовское	5,1±1,2	5,0±1,2	4,5±0,8	3,5±0,3	4,5±0,9
Имрус	1,3±0,1	2,0±0,1	2,03±0,2	3,1±0,5	2,1±0,2

В последнем случае только у сорта Кандиль орловский он практически не менялся в течение четырех пассажей. У сорта Имрус при концентрации БАП 2,0 мг/л наблюдали увеличение числа дополнительных побегов к четвертому пассажиру.

У сорта Кандиль орловский наибольший коэффициент размножения (5,1) был в четвертом пассаже при концентрации БАП 1,0 мг/л, однако наибольшее среднее значение этого показателя наблюдается в присутствии БАП 2,0 мг/л. Ту же реакцию мы видели и у сорта Болотовское. У сорта Орловское полесье наибольшая степень пролиферации была отмечена на среде, содержащей БАП 1,0 мг/л.

Увеличение коэффициента размножения в первом пассаже при БАП 2,0 мг/л можно объяснить тем, что резкая смена концентрации фитогормона в сторону увеличения способствовала закладке у имеющихся микропобегов большего количества боковых почек. Постоянное же культивирование при повышенной концентрации БАП приводит к затуханию этого процесса. Это говорит о том, что возможно для увеличения коэффициента размножения необходимо чередование сред с низкой и высокой концентрацией 6-БАП. В дальнейшем мы планируем провести исследования в этом направлении.

Помимо разницы в коэффициенте размножения при низкой и высокой концентрациях гормона мы наблюдали и различное развитие микропобегов. На фоне 1,0 мг/л 6-БАП у всех сортов образовывалось большое количество побегов, имеющих длину побега от 1,5 до 3см и хорошо развитыми листьями, т. е. пригодных к укоренению, тогда как при более высокой концентрации цитокинина в основном образовывались побеги менее 1 см в длину.

Выводы

На этапах введения и размножения наблюдали влияние на развитие эксплантов генетических особенностей сортов. Так у сорта Имрус был отмечен наименьший процент контаминации, не зависимо от периода введения и типа стерилизующего агента, но в то же время на этапе размножения отмечали низкий коэффициент размножения.

На приживаемость меристем и их развитие в большей степени оказал влияние период введения. Наиболее благоприятным сроком введения оказалась фаза активного роста (июнь). Стерилизующий эффект сулемы и мертиолята по периодам введения в культуру был одинаков.

На этапе размножения у сортов Болотовское и Кандиль орловский при концентрации БАП 2,0мг/л коэффициент размножения увеличивается, а сортов Имрус и Орловское полесье снижается. Концентрация БАП 1,0мг/л способствует образованию микропобегов, пригодных для укоренения.

Литература

1. Бъядовский И.А. Влияние различных концентраций 6-Бензиламинопурина и тидиазурона на коэффициент размножения клоновых подвоев яблони и груши в культуре in // Плодоводство и ягодоводство России. Т.37. 2013. №1. С. 52-55.
2. Ван-Ункан Н. Ю., Савельев Н. И., Олейникова О. Я Микрোকлональное размножение колоновидных сортов яблони // Биотехнология в плодоводстве: мат. междунар. науч. конф., аг. Самохваловичи, 13–17 июня 2016 г. Самохваловичи. 2016. С. 32-34.
3. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений М., 1983. 96 с.
4. Джигадло Е.Н., Джигадло М.И., Голышкина Л.В. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Орел: ВНИИСПК, 2005. 49 с.
5. Седов Е. Н., Седышева Г. А., Макаркина М. А., Серова З. М., Корнеева С. А. Приоритетные направления в селекции яблони // Селекция и сорторазведение садовых культур. Орел: ВНИИСПК, 2014. С. 5-28.
6. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Дегтярев С.В., Кочиева Е.З., Прокофьев М.И., Новиков Н.Н., Ковалев В.М., Калашников Д.В. Сельскохозяйственная биотехнология. М.: Высшая школа, 1998. 416 с.
7. Ташматова Л.В., Мацнева О.В., Шахов В.В., Хромова Т.М. Особенности первого этапа клонального микроразмножения иммунных сортов яблони // Современное садоводство – Contemporary horticulture. 2018. №3. С. 14-21. DOI: <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2018-10315>
8. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Технология клонального микроразмножения яблони и груши (методические рекомендации). Мичуринск: ВСТИСП, 2008. 32с.
9. Кухарчик Н.В., Кастрицкая М.С., Семенас С.Э, Колбанова Е.В., Красинская Т.А., Волосевич Н.Н., Соловей О.В., Змушко А.А., Божидай Т.Н., Рундя А.П., Малиновская А.М. Размножение плодовых и ягодных растений в культуре in vitro. / под общ. ред. Н.В. Кухарчик. Минск : Беларуская навука, 2016. 235 с.
10. Фролова Л.В. Оптимизация некоторых этапов клонального микроразмножения яблони // Плодоводство и ягодоводство России. 2011. Т.26. С. 250-255.

References

1. Byadovsky, I.A. (2013). The effect of different concentrations of 6-benzylaminopyrine and thidiazuron on the coefficient of propagation of clonal apple and pear rootstocks *in vitro*. *Pomiculture & Small Fruits culture in Russia*. 37,1, 52-55. (In Russian).
2. Van-Unkan, N.Yu., Saveliev, N.I., & Oleynikova, O.Ya. (2016). In vitro propagation of columnar apple cultivars. In *Biotechnology in fruit-growing: Proc. Sci. Conf.* (pp. 32-34). Samohvalovichy (In Russian).
3. Kataeva, N.B., & Butenko, R.G. (1983). *Clonal micro propagation of plants*. Moscow. (In Russian).
4. Dzhigadlo, E.N., Dzhigadlo, M.I., & Golyshkina, L.V. (2005). *Methodical recommendations for using biotechnological methods in work with fruit, berry and ornamental crops*. Ore: VNIISPK. (In Russian).
5. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., Makarkina, M.A., Serova, Z.M., & Korneyeva, S.A. (2014). Priority directions in apple breeding. In: *Breeding and variety propagation of orchard crops. Breeding and variety cultivation of fruit and berry crops* (pp. 5-28). Ore: VNIISPK. (In Russian, English abstract).

6. Sheveluha, V.S., Kalashnikova, E.A., Degtyarev, S.V., Kochieva, E.Z., Prokofev, M.I., Novikov, N.N., Kovalev, V.M., & Kalashnikov, D.V. (1998). Agricultural Biotechnology. Moscow: Vysshaya Shkola. (In Russian).
7. Tashmatova, L.V., Matzneva, O.V., Shakhov, V.V., & Hromova, T.M. (2018). Features of the first stage of clonal micropropagation of immune apple varieties. *Contemporary horticulture*, 3, 14-21. <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2018-10315> (In Russian, English abstract)
8. Matushkina, O.V., & Pronina, I.N. (2008). Technology of clonal apple and pear micropropagation (methodical recommendations). Michurinsk: VSTISP. (In Russian).
9. Kukharchik, N.V., Kastriiskaya, M.S., Semenas, S.E., Kolbanova, E.V., Krasinskaya, T.A., Volosevich, N.N., Solovej, O.V., Zmushko, A.A., Bozhidai, T.N., Rundya, A.P., & Malinovskaya, A.M. (2016). *Reproduction of fruit and berry plants in culture in vitro*. Minsk: Belaruskaya navuka. (In Russian).
10. Frolova, L.V. (2011). Optimization of some stages of clonal micro propagation of apples. *Pomiculture & Small Fruits culture in Russia*. 26, 250-255. (In Russian, English abstract).