

**В.Е. Джафарова**, кандидат

сельскохозяйственных наук

**Л.В. Голышкин**, кандидат

сельскохозяйственных наук

**Е.А. Долматов**, доктор

сельскохозяйственных наук

**Л.В. Ташматова**Государственное научное  
учреждение Всероссийский НИИ  
селекции плодовых культур,  
г. Орел, Россия

# Особенности развития апомиктических растений (*Pyrus communis* L.) / (*Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl.) в условиях *in vitro*

Надані особливості розвитку на етапі мікророзмноження чотирьох зразків апоміктичних рослин, отриманих із зародку від опилення груші пилком хеномеліса японського на 55 і 70 доби їхнього розвитку. Показана різна відповідна реакція зразків на досліджувану концентрацію цитокініна (6-БАП) і його сполучення з гібереліновою кислотою (ГК). Відмічено тенденцію збільшення коефіцієнта розмноження окремих номерів за зміни концентрації БАП (біологічно активного препарату) від 1 мг/л до 2 мг/л або сполучення БАП з ГК.

Для оптимізації етапу формування конгломератів (бруньок і пагонів) необхідно чергувати концентрацію БАП 1 і 2 мг/л через пасаж на фоні 1,5 мг/л ГК.

Уперше спостерігалось походження коренів апоміктичних рослин на етапі ризогенезу та вивчено анатомічну будову коренів в умовах *in vitro*. Формування коренів *in vitro* відбувається у внутрішніх тканинах пагона. Коріння апоміктичних рослин, утворене в умовах *in vitro*, є за характеристикою первинним, як і в рослин, розвинутих *in vivo*.

## Ключові слова:

апоміктичні рослини, мікророзмноження, коріння, соматичний ембріогенез.

**Введение.** В 1996 г. Е.А. Долматовым были получены семена от опыления груши пыльцой хеномелеса японского, дающие начало диплоидным растениям [1]. Использование генетических маркеров позволило установить, что семена от подобных скрещиваний развивались из зародышевых мешков, претерпевших мейоз. Этот факт позволил предположить наличие у груши псевдодиплоидного апомиксиса и возможность получения высокогомозиготных растений. Установлено, что наряду с нормально развитыми семенами образовывалось большое количество щуплых, которые могли иметь диплоидный или гаплоидный набор хромосом, их зародыши погибают на разных этапах своего развития [2]. Устраняя причины гибели зародышей на ранних этапах разви-

тия, в свое время были получены апомиктические растения от скрещивания кукурузы с трипсакумом и растения от опыления фикуса афганского пыльцой белой шелковицы [3, 4, 5].

Практическое использование метода культуры зародышей на ранних стадиях развития позволило нам получить полноценные растения отдельных номеров межвидовых гибридов и высадить их *in vivo* [6]. Часть номеров пока не удалось адаптировать в нестерильных условиях. Одни из них не образуют корней на этапе ризогенеза, другие – образуют корни, но погибают при адаптации. На этапе собственно микроразмножения нами отмечено, что конгломераты № 8 из семьи груша Белорусская поздняя х хеномелес японский и № 1 из семьи 9.61.65 (Лимонка х Ильянка) х хеномелес японский

в сравнении с другими номерами от пассажа к пассажию состоят из побегов меньшего размера и напоминают «шар». 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) их приживаемость по результатам наших исследований не превышает 50,5%. Наряду с общеизвестными трудностями данного этапа (нарушение деятельности устьичного аппарата и отсутствие корневых волосков) исследователи называют аномальное строение корней растений,

Таблица

## Показатели этапа пролиферации апомиктических номеров груши

№ образца	Коэффициент размножения	Среднее количество почек на конгломерат, шт.	Средняя высота побегов, мм	Количество побегов, пригодных для укоренения, %
БАП : 1 мг/л				
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±0,2г	11,0±2,5	15,6
БАП : 2 мг/л				
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
БАП (1 мг/л) + ГК (1,5 мг/л)				
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
БАП (2 мг/л) + ГК (1,5 мг/л)				
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

образованных *in vitro* [1] и ризогенез в каллюсной ткани [5]. В то же время детальные исследования в этом направлении пока не проводятся. В связи с этим возникает необходимость изучения развития апомиктических растений с целью получения побегов, пригодных к укоренению.

Анализ происхождения корней, а также их строения позволит оценить их потенциал для адаптации апомиктических растений к нестерильным условиям.

**Методика исследований.** В исследование были включены четыре апомиктических образца растения: 2 (№ 12, № 8) из семьи груша Белорусская поздняя х хеномелес японский и 2 (№ 1, № 5) из семьи 9.61.65 (Лимонка х Ильинка) х хеномелес японский. Они представляли собою растения, выросшие из различных зародышей, в возрасте 55–70 дней с момента опыления.

Для изучения степени пролиферации образцов использованы микропобеги, выросшие *in vitro*. В процессе культивирования учитывали количество почек и микропобегов на эксплант, среднюю длину микропобега. Учитывали микропобеги высотой от 5 мм. Новообразования менее 5 мм относили к разряду почек. Также учитывали побеги, пригодные для укоренения; по высоте они должны быть не менее 1,5 см. Такая высота в условиях *in vitro* считается оптимальной на этапе ризогенеза [9].

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 с использовани-

ем микроскопа Eclipse 80i фирмы Nikon (Япония) [10].

**Результаты исследований и их обсуждение.** Важной составляющей этапов микро-размножения *in vitro* является эффективное пролиферирование микропобегов. Анализируя результаты этапа пролиферации апомиктических растений (в течение 4-х пассажей), отметим тенденцию 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 х хеномелес японский (таблица). 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 способствовала увеличению коэффициента размножения до 5,3–5,5, а также удлинению побегов, хотя и незначительному.

В семье 9.61.65 х хеномелес японский наибольший коэффициент размножения был у № 5 на среде с цитокинином в 2 мг/л и его сочетании с ГК. Гибберелловая кислота так же оказала свое влияние на вытягивание апомиктических микропобегов у образца № 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. При этом средняя высота побега была больше, чем у других образцов.

Сравнительное изучение номеров по количеству побегов, пригодных для укоренения в зависимости от концентрации

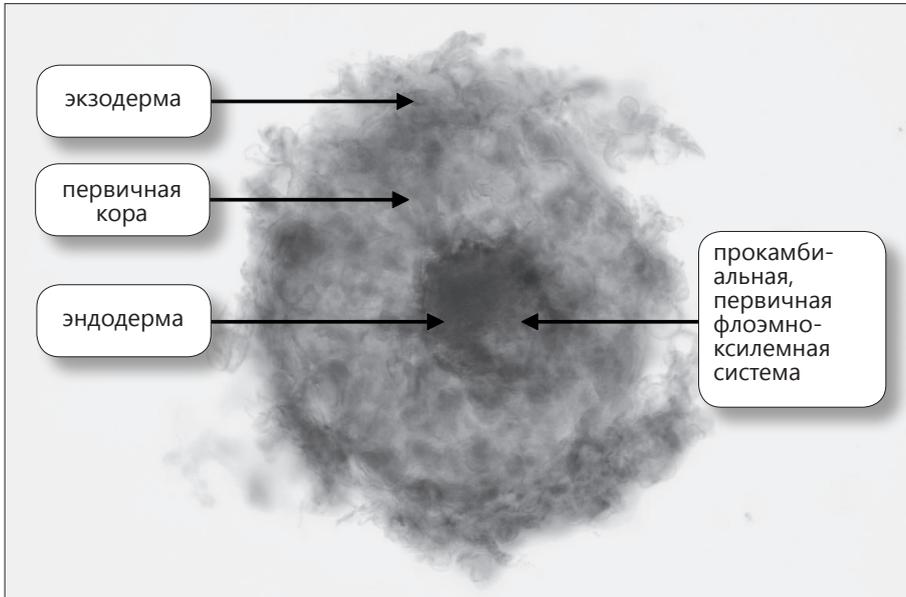


Рис. 1. Анатомическое строение корня апомиктического растения № 7, выросшего *in vitro*.

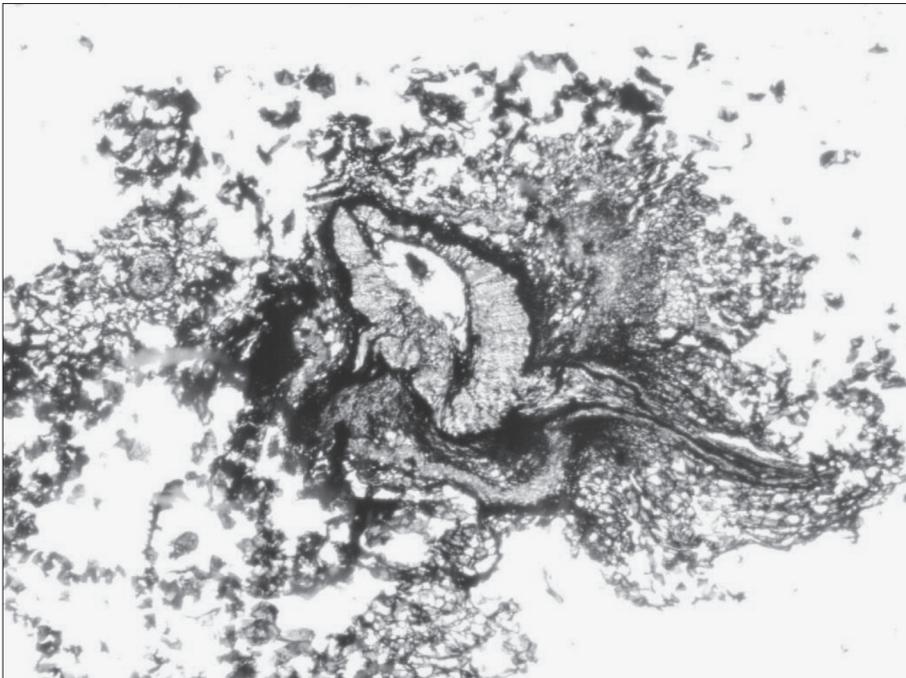


Рис. 2. Поперечный срез «корень-побег» апомиктического образца № 7.

цитокинина и его сочетания с ГК, позволило установить, что с увеличением концентрации цитокинина сокращается индуцирование побегов, пригодных к укоренению. Лучшие условия для пролиферации побегов создаются в среде, содержащей 1 мг/л БАП и 1,5 мг/л ГК (табл.). Однако при проведении длительного процесса пролиферации в среде, где БАП: ГК=1:1,5,

происходит заметное снижение эффективности микроразмножения. Эту особенность подтверждает отсутствие устойчивого повышения коэффициента размножения от пассажа к пассажу при изучении степени пролиферации апомиктических растений на протяжении 4-х месяцев.

Анализ конгломератов показал, что короткие побеги, вы-

сотой менее 1,5 см составляют от 29 до 100% в зависимости от апомиктического номера. При этом было выявлено и то, что в присутствии ГК увеличивалась длина побегов, а значит и их количество, пригодное для этапа ризогенеза. Для оптимизации этапа формирования множественных почек и 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 корневых волосков растения останавливаются в росте, листья опадают и растения погибают. Еще одной причиной гибели растений, как уже отмечалось выше, считают аномальное строение корней. В нашем случае важно было учесть этот непроверенный факт в связи с тем, что в нестерильных условиях выход таких растений пока еще сравнительно мал, а перед нами стоит задача увеличить выход апомиктических растений.

Анатомическими исследованиями было выявлено, что корни апомиктических растений, образованные в условиях *in vitro*, являются первичными, как и у растений, развивают *in vivo*. На поперечном срезе корня легко разграничиваются две основные структуры: первичная кора и центральный цилиндр (рис. 1). Первичная кора представлена экзодермой, эндодермой и расположенной между ними мезодермой. Центральный цилиндр ясно отграничен

и даже обособлен от коры, он содержит в себе первичную флоэмно-ксилемную систему. Отмеченные особенности анатомического строения корней растений говорят об отсутствии каких-либо аномалий.

Этап укоренения микропобегов часто сопровождается образованием каллюса. Считается, что корни в таких случаях образуются из каллюса, 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 каллюсного происхождения. Формирование корневых зачатков, их дифференциация и дальнейший рост проходят во внутренних тканях стебля. В данном случае это не может являться причиной низкой адаптации микрорастений (рис. 2).

**Выводы.** Из результатов проведенных исследований следует,

что коэффициент размножения апомиктических микрорастений увеличивается при изменении концентрации цитокинина в питательной среде 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. Формирование корневых зачатков проходит во внутренних тканях стебля.

### ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Долматов, Е.А. Стимулятивный апомиксис и проблема получения гомозиготных растений у груши / Е.А. Долматов // Селекция и сорторазведение садовых культур. – Орел: ВНИИСПК, 1996. – С. 111–122.
2. Долматов, Е.А. Апомиксис и экспериментальная гаплоидия у груши / Е.А. Долматов, Н.И. Панова // Селекция и сорторазведение садовых культур. – Орел: ВНИИСПК, 1998. – С. 276–280.
3. Юдин, Б.Ф. Экспериментальная полиплоидия и изучение апомиксиса у кукурузы. / Б.Ф. Юдин // Апомиксис и селекция. – Москва: Наука, 1970. – С. 66–72.
4. Арндт, Н.К. Изменчивость апомиктических сеянцев некоторых видов фикуса / Н.К. Арндт // Апомиксис и селекция. – Москва: Наука, 1970. – С. 55–66.
5. Здруйковская-Рихтер, А.И. Культивирование апомиктических зародышей *in vitro* / А.И. Здруйковская-Рихтер // Апомиксис и селекция. – Москва: Наука, 1970. – С. 165–170.
6. Джафарова, В.Е. Элементы технологического процесса получения апомиктических растений груши с использованием методов *in vitro* / В.Е. Джафарова, Е.А. Долматов, Л.В. Ташматова // Методические рекомендации. – Орел, 2011. – 20 с.
7. Высоцкий, В.А. Использование микропрививок при клональном микроразмножении косточковых культур / В.А. Высоцкий, Е.В. Олешко / Сельскохозяйственная биология. – 1988. – № 4. – С. 75–77.
8. Майорова, Ю.А. Оптимизация этапов клонального микроразмножения гибридов вишни на основе применения новых биологически активных веществ / Ю.А. Майорова: автореферат дис. на соиск. учен. степени канд. с.-х. наук. – Краснодар, 2009. – 24 с.
9. Матушкина, О.В. Влияние некоторых биологических, морфологических и механических факторов на регенерацию яблони и груши *in vitro* / О.В. Матушкина, И.Н. Пронина // Плодоводство и ягодоводство России. – Москва, 2011. – Т. XXVI. – С. 63–69.
10. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – Москва: ВО «Агропромиздат», 1988. – 271 с.