

В.Е. Джафарова,

кандидат сельскохозяйственных наук

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, г. Орел, Россия

Ауксиновая активность пиклорама в каллюсо- и морфогенезе пыльников яблони (*Malus domestica* Borkh)

Приведені результати вивчення каллюсо- і морфогенезу пильників імунних проти парші сортів яблуні з використанням піклорама. Виявлена ауксинова активність даного препарату як в темряві, так і на світлі.

Ефективність каллюсогенезу досліджуваних сортів варіювала від 26,0 до 83,3% в залежності від концентрації піклорама в темряві та від 11,3 до 74,9% в умовах слабого освітлення. Оптимальним рівнем концентрації піклорама вважаємо 4 мг/л середовища, оскільки дана концентрація забезпечить найкращі показники каллюсогенезу досліджуваних сортів яблуні. Калюс, сформований у темряві на середовищі з піклорамом, бугорчатий, щільний, білого чи молочного забарвлення. Калюс, сформований на світлі, інтенсивно зелений або зеленувато-білий, більш щільний, з чітко накресленими меристематичними осередками.

Морфологічні ознаки калюсів, отриманих на середовищі з піклорамом, стабільні за роками.

За співвідношення ауксин : цитокінін 1 : 2 (піклорам : БАП) індуковане коріння у сорту Юбилей Москви. У сорту Свежесть – за співвідношення ауксин : цитокінін 3 : 9 (піклорам : БАП, цитокінін). У сорту Орловское полесьє зафіксовано утворення 4-х бруньок за концентрації ауксин : цитокінін 1 : 20.

Ключові слова:

пильники яблуні, ауксинова активність, піклорам, калюсні тканини.

Введение. Культивирование незрелых пыльников, содержащих микроспоры на определенной стадии развития, в оптимальных условиях может приводить к делению гаметофитных клеток и регенерации растений. Культура пыльников является одним из путей получения гаплоидных растений. Удвоение числа хромосом превращает гаплоид в фертильное гомозиготное диплоидное растение. Применение гаплоидных растений в селекции позволяет создавать константные нерасщепляющиеся гомозиготные формы в первой генерации и сокращать селекционный процесс; упрощать мутационную селекцию; получать каллюсную ткань, содержащую клетки разных уровней пloidности, что является дополнительным источником в селекции [1, 2].

Развитие пыльцевого каллюса многолетних плодовых культур преимущественно идет по пути косвен-

ного андрогенеза. Обязательным условием дифференциации растительной клетки и превращения ее в каллюсную является присутствие в питательной среде представителей двух групп фитогормонов: ауксинов и цитокининов [3]. Мощным индуктором морфогенеза в каллюсной ткани также является наличие в среде цитокининов и ауксинов, а также их соотношение. Ауксины, используемые на этапе морфогенеза, традиционны. Это 2,4-Д, ИУК, НУК. Наилучшая результативность процесса андрогенеза пока характерна для однолетних культур. Получение гаплоидных растений из изолированных пыльников многолетних культур не стабильно и малорезультативно.

В 1963 году the Dow Chemical Company индуцировала 4-амино-3,5,6 – трихлорпиколиновую кислоту (торговое наименование тордон, химическое название – пи-

клорам) как гербицид для борьбы с сорной растительностью. Действие этой кислоты на клетки наступает уже через 30 минут, оно проявляется в изменении состояния ядра, затем цитоплазмы и оболочки. Действуя как гербицид, пиклорам быстро проникает в клетки и передвигается к активно растущим меристематическим тканям. Данное вещество эффективно не только как гербицид, но еще обладает и высокой ауксиновой активностью [4]. Основной функцией ауксина в культурах тканей и клеток растений является его участие в регуляции размножения клеток. Именно этим обусловлено его неперемное включение в питательные среды для культур тканей и использование как важнейшего средства управления ростом и морфогенезом в изолированной культуре [5]. Действие 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновой кислоты, так же как и ауксинов, сопровождается

усилением накопления белка и нуклеиновых кислот [6].

Применение пиклорама в условиях *in vitro* на однолетних культурах, в частности, для получения каллюсов у бобовых и злаковых, показало его более высокую стимулирующую активность по сравнению с 2,4-Д, ИУК и НУК [7, 8, 9]. Данный препарат проявил высокую активность в индукции образования каллюса и его размножения у лука [10]. Каллюс, полученный с помощью пиклорама, дает лучший органогенез при посадке на органообразующую среду [6, 7] и по сравнению с 2,4-Д имеет более низкую фитотоксичность [11, 12]. При выращивании каллюсов на свету, пиклорам в отличие от 2,4-Д не ингибирует синтез хлорофилла и, поэтому, более пригоден для получения органогенных каллюсов [13].

По сравнению с однолетними культурами возможности индукции каллюсогенеза и морфогенеза у яблони ограничены и результативность еще мала: морфогенетические процессы индуцируются крайне редко и характеризуются нестабильностью. Из отдельных ценных генотипов вообще не удается получить растения-регенеранты из пыльцевого каллюса [14], поскольку каллюсная ткань, возникшая из пыльников, не всегда способна к морфогенезу.

Принимая во внимание до сих пор низкий выход гаплоидов при культивировании пыльников многолетних плодовых растений с одной стороны и преобладающую ауксиновую активность препарата пиклорам на однолетних культурах в сравнении с традиционно используемыми (2,4-Д, НУК, ИУК) с другой стороны, необходимо было изучить возможности каллюсо- и морфогенеза яблони с использованием пиклорама. К тому же, данные по его применению в индукции каллюса и органогенеза у плодовых культур отсутствуют.

Методика исследований. В работе использовали пыльники

иммунных к парше сортов яблони Орловское полесье и Юбилей Москвы. В сухую погоду для посева пыльников бутоны отбирали по внешним признакам, считающимися для яблони наиболее продуктивными в отношении каллюсообразования (соцветие выдвинуто, бутоны в нём плотно сомкнуты, без белого конуса, их пыльники зеленовато-желтого цвета). Бутоны помещали в чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой и ставили в холодильничек на 3–7 дней при температуре +3–+4°C.

Посев пыльников проводили на среду Мурасиге-Скуга в асептических условиях из расчета один бутон на пробирку. Посеянные пыльники культивировали при температуре 25°C в термостате и в условиях 16 часового фотопериода с интенсивностью освещения до 1000 лк и влажностью воздуха 60–70% в светомомнате.

Среды, используемые для индукции каллюсообразования и органогенеза, содержали макро- и микро-соли, витамины В₁, В₆, РР по 0,5 мг/л, гидролизат казеина – 600 мг/л, мезоинозит – 100 мг/л, сахарозу – 20 г/л и агар-агар, концентрация последнего варьировала в зависимости от его вида.

Для оценки ауксиновой активности пиклорама в процессе каллюсогенеза за основу брали рекомендованный второй вариант среды МС для яблони [2]. Соотношение ауксин : цитокинин в индукции каллюсообразования базового варианта среды равнялось 1 : 1. Концентрацию пиклорама подбирали эмпирически.

Результаты исследований.

Культивирование изолированных пыльников яблони иммунных к парше сортов на искусственной питательной среде показало, что репродуктивные клетки развивались по пути косвенного андрогенеза. Начало каллюсообразования в темноте отмечалось через 10–28 дней, а на свету – через 14–28 дней. Ча-

Таблица 1

Эффективность каллюсогенеза у пыльников яблони в присутствии пиклорама, %.

Сорт	Питательная среда	Частота каллюсообразования (в %) при культивировании пыльников в:	
		термостате	светомомнате
2005 г.			
Орловское полесье	МС	56,3±1,5	43,1±1,0
	МСП ₂ *	50,2±1,5	14,5±0,7
	МСП ₄ **	39,8±0,9	22,6±1,0
Юбилей Москвы	МС	45,1±1,0	38,3±1,1
	МСП ₂	26,6±1,1	11,3±0,5
	МСП ₄	39,1±1,0	21,3±0,9
2006 г.			
Орловское полесье	МС	69,2±1,2	56,1±1,1
	МСП ₂	57,0±1,3	12,9±0,7
	МСП ₄	82,0±0,5	58,1±0,7
Юбилей Москвы	МС	80,3±1,0	47,2±1,3
	МСП ₂	39,7±0,9	12,5±0,8
	МСП ₄	83,3±0,4	74,9±0,5
2007 г.			
Орловское полесье	МС	38,4±0,9	25,8±0,9
	МСП ₄	26,9±1,1	18,9±0,7
	МСП ₆ ***	40,0±1,0	20,3±0,8
Юбилей Москвы	МС	49,4±1,3	31,7±1,1
	МСП ₄	31,0±1,0	13,0±0,8
	МСП ₆	26,0±0,9	14,5±0,7

*, **, *** – среда Мурасиге-Скуга с добавлением соответственно 2 мг/л; 4 мг/л, 6 мг/л пиклорама.

стота каллюсообразования пыльников яблони различалась по годам: наибольшей она была в 2006 г. и варьировала от 39,7 до 83,3% при выращивании каллюса в темноте. В условиях пониженного освещения данный показатель был в пределах 12,5–74,9% (табл. 1).

Для оценки действия пиклорама на этапе каллюсогенеза использовали три уровня. Было установлено, что за годы исследований пиклорам проявил значительную ауксиновую активность в индукции каллюсообразования. Эффективность каллюсогенеза исследуемых сортов варьировала от 26,0 до 83,3% в зависимости от концентрации пиклорама в темноте и от 11,3 до 74,9% в условиях пониженного освещения. При этом оптимальным уровнем

концентрации пиклорама считаем 4 мг/л, поскольку, за все годы исследований (и те, которые не представлены в таблице) именно такая концентрация давала наилучшие показатели каллюсогенеза обоих сортов яблони как в темноте, так и на свету.

Каллюс, сформированный в темноте на среде с пиклорамом, бугорчатый, плотный, белого или молочно-белого цвета. При перенесении такого каллюса на свет половина его поверхности зеленеет в 99 из 100 случаев, тогда как без пиклорама – от 32% до 51% в зависимости от сорта. Каллюс, сформированный на свету, изначально имел интенсивно зеленую или зеленовато-белую окраску, более плотный, чем сформированный в темноте, с четко очерченными меристематическими очагами. Каллюс, образовавшийся в темноте без пиклорама, при его дальнейшем пассировании приобретает водянистую структуру или

рано стареет, что характерно для всех сортов, хотя и в разной степени. Таких негативных особенностей в каллюсах на среде с пиклорамом не отмечалось. Морфологические признаки каллюсов, полученных на среде с пиклорамом стабильны из года в год.

Способность каллюсных клеток к морфогенезу определяется соотношением цитокининов и ауксинов, входящих в состав питательных сред. При использовании пиклорама в качестве ауксина, были получены корни у сорта Юбилей Москвы при соотношении ауксин : цитокинин 1 : 2 (пиклорам : БАП). В каллюсной массе сорта Свежесть также индуцированы корни, но при соотношении ауксин : цитокинин 3 : 9 (пиклорам : БАП, кинетин). Корни формировались внутри каллюсной ткани. Изменение соотношения концентрации ауксин : цитокинин 1 : 20 положительно сказалось на морфогенной способности пыль-

цевого каллюса сорта Орловское полесье. У данного сорта отмечено образование 4-х почек. Использование вместо пиклорама только НУК в тех же концентрациях не способствовало индукции морфогенеза у исследуемых сортов.

Выводы. Испытание пиклорама в качестве индуктора каллюсо- и морфогенеза в развитии пыльников яблони показало его значительную ауксиновую активность. Развитие пыльников иммунных к парше сортов яблони проходило по пути косвенного андрогенеза. Оптимальная концентрация пиклорама на этапе каллюсогенеза – 4 мг/л. Индуцированы корни у сорта Юбилей Москвы, а также почки у сорта Орловское полесье. Проявление морфогенных процессов в каллюсных тканях изученных сортов яблони предполагает применение данного препарата на других плодовых многолетних культурах.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Гапоненко, А.К. Перспективы использования культуры клеток растений в селекции / А.К. Гапоненко // Успехи современной генетики. – М.: Наука, 1987. – Вып. 14. – С. 64–74.
- Жуков, О.С. Методические рекомендации по получению растений-регенерантов плодовых пород в культуре пыльников / О.С. Жуков, О.Я. Олейникова, Н.И. Савельев. – Мичуринск, 1994. – 36 с.
- Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярев [и др.]. – М.: Высш. шк., 1998. – 416 с.
- Kefford, N.P., Caso, O.N. A potent auxin with unique chemical structure – 4 – amino -3,5,6 – trichloropicolinic acid. / N.P. Kefford, O.N. Caso. // Bot. Gaz. – 1966. – Vol. 127. – N 2/3. – С. 159–163.
- Гамбург, К.З. Ауксины в культурах тканей и клеток растений / К.З. Гамбург, Н.И. Рекославская, С.Г. Швецов. – Новосибирск: Наука, 1990. 243 с.
- Калинин, Ф.Л. Физиология и биохимия культурных растений / Ф.Л. Калинин, В.К. Мусияка. – 1974. – Т. 6, В. 4. – С. 365.
- Dulieu, H., Vallee, J. – C., Martin, G. Quelques effets de l'acide 4 – amino – 3,5,6 – trichloropicolinique (piclorame) sur les tissus de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. c. en. culture in vitro. / H. Dulieu, J. – C. Vallee, G. Martin // C.R. Acad. Sci. – 1972. – Vol. D. 274. – №18. – P. 2574–2577.
- Мусияка, В.К. Активизация деления и растяжения клеток культуры ткани табака в присутствии 4 – амино – 3,5,6 – трихлорпиколиновой кислоты / В.К. Мусияка, Ф.Л. Калинин // Физиология и биохимия культурных растений. – 1975. – Т. 7., № 5. – С. 486–492.
- Vian, W.E. The effectiveness of picloram as an auxin source compared to 2,4-D in wheat callus culture medium / W.E. Vian. // Agron. Abstr. – 1976. – P. 65.
- Phillips, G.C. Effects of picloram and other auxins on onion tissue cultures / G.C. Phillips, K.J. Luteyn. // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 1983. – Vol. 108., № 6. – P. 948–953.
- Чернова, Л.К. Сравнение дифференцирующего воздействия 2,4-Д и 4 – амино – 3,5,6 – трихлорпиколиновой кислоты на ткани бобовых и злаковых растений / Л.К. Чернова, М.Н. Прохоров, Б.В. Филин-Колдаков // Физиология растений. – 1975. – Т. 22, № 2. – С. 170–175.
- Mok, M.G. Genotypic responses to auxins in tissue cultures of *Phaseolus* / M.G. Mok, D. W. S. Mok // Physiol. Plant. – 1977. – V. 40, № 4. – P. 261–264.
- Collins, G.B. Use of 4 – amino – 3,5,6, - trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissue cultures / G.B. Collins, W.E. Vian, G.C. Phillips // Crop Sci. – 1978. – V. 18, № 2. – P. 286–288.
- Хохлов, В.С. Гаплоидия и селекция / В.С. Хохлов, В.С. Гришина. – М.: Наука, 1976. – 221 с.