

УДК 634.11:581.143.6

## КАЛЛУСО- И МОРФОГЕНЕЗ ПЫЛЬНИКОВ ИММУННЫХ К ПАРШЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ (*Malus domestica* Borkh.) В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

*В. Е. Джафарова, кандидат сельскохозяйственных наук  
Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ селекции плодовых культур,  
г. Орел, Россия*

**Введение.** В прошлом столетии значительное развитие получил метод «андрогагенеза», т.е. культивирование *in vitro* пыльников. Основной интерес вызван получением гаплоидных растений из пыльцы в культуре *in vitro*. Явление гаплоидии было открыто в 1922 г. и первое гаплоидное растение *Datura stramonium* было получено в том же году [1].

Уже к середине 30-х годов были получены и изучены десятки гаплоидов у разных видов растений. Тогда же были высказаны идеи о получении из гаплоидов абсолютно гомозиготных диплоидных линий и использовании их в селекции [2, 3].

Культивирование изолированных пыльников основано на развитии тысяч микроспор, каждая из которых может дать гаплоидное растение. Применение гаплоидных растений в селекции позволяет сегодня создавать константные нерасщепляющиеся гомозиготные формы в первой генерации, и таким образом со-

кращать селекционный процесс на 3-4 генерации, характерные для обычной схемы селекции; упрощать мутационную селекцию, поскольку у гаплоидов отсутствует доминирование и все гены имеют фенотипическое проявление; получать каллусную ткань, содержащую не только гаплоидные клетки, но и клетки других уровней ploidy, что может быть дополнительным источником для селекции [4, 5].

Использование техники культивирования пыльников позволило создать целый ряд сортов риса, пшеницы, табака, ячменя и других культур. Удалось получить андрогенные растения многолетних плодовых культур: земляники, яблони, цитрусовых [6-8].

Успешное использование культивирования *in vitro* пыльников и получение андрогенных гаплоидов однолетних и многолетних культур послужили причиной для подобных исследований с 2005г в ГНУ ВНИИСПК.

Методика исследований. Основной задачей наших исследований на начальном этапе являлось изучение особенностей каллусогенеза и возможности органогенеза сортов яблони иммунных к парше.

В работе использовали пыльники сортов яблони Орловское полесье, Афродита, Свежесть, Юбилей Москвы. В сухую погоду для посева пыльников бутоны отбирали по внешним признакам, считающимися для яблони наиболее продуктивными в отношении каллусообразования (бутоны выдвинуты, но плотно сомкнуты, без белого конуса, их пыльники зеленовато-желтого цвета). Их помещали в чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой и ставили в холодильник на 3 дня при температуре +3-4°C.

Посев пыльников проводили на среду Мурасиге-Скуга и Хеллера для выявления лучшего каллусообразования. Работа по посеву пыльников проводилась в асептических условиях из расчета один бутон на пробирку. Посеянные пыльники культивировали в термостате при температуре 25°C в условиях 16 часового фотопериода с интенсивностью освещения до 1000 люкс и влажностью воздуха 60-70%.

Среды, используемые для индукции каллусообразования и получения растений-регенерантов, содержали макро- и микросоли, витамины B<sub>6</sub>, PP по 0,5 мг/л, гидролизат казеина 600-800 мг/л, мезоинозит - 100 мг/л, сахарозу - 20 г/л, и агар, концентрация которого варьировала в зависимости от его вида. В среды были включены еще стимуляторы роста: ауксины, цитокинины, гиббереллин. В группу использованных ауксинов вошли НУК, ИУК, 2,4-Д, пиклорам; в группу цитокининов - кинетин и шесть БАП. Соотношение ауксин:цитокнин в индукции каллусообразования равнялось 1:1.

Пиклорам в исследования включен в связи с его высокой ауксиновой активностью на многих однолетних культурах. Он эффективнее ИУК и НУК в индукции образования каллуса; на эксплантах табака в сочетании с кинетином стимулировал образование почек [9]. При каллусогенезе у бобовых и злаковых отмечена его более высокая стимулирующая активность по сравнению с 2,4-Д и значительно более низкая фитотоксичность

[10]. К тому же пиклорам в отличие от 2,4-Д не ингибирует синтез хлорофилла при выращивании каллусов на свету и поэтому более пригоден для получения органогенных каллусов [11].

Выбор пиклорама обусловлен был еще и тем, что при культивировании пыльников многолетних плодовых растений отмечен низкий выход каллусов и эмбриоидов, у отдельных генотипов вообще не удавалось получить регенеранты. К тому же данные по применению пиклорама в индукции каллуса и органогенеза у плодовых культур отсутствуют.

Пробирки с образовавшимся в темноте каллусом помещали в светокomнату с интенсивностью освещения до 1500 люкс в условиях 16-часового фотопериода. Через 10 дней каллусы переносили на питательные среды для индукции морфогенеза.

Результаты исследований. В зависимости от складывающихся весенних погодных-климатических условий и их влияния на формирование пыльников начало образования каллуса варьировало от 10 дней до четырех недель в темноте и от двух до семи недель на свету. Частота каллусообразования пыльников изучаемых сортов яблони различалась по годам: наибольшей она была в 2006 г. и находилась в пределах 57,0-93,1% при формировании каллуса в темноте. На свету данный показатель варьировал от 12,5 до 63,4%. Наименьшее каллусообразование по сортам было в 2007 г. и составило от 26,0 до 71,4% в темноте, 13,0-31,7% - на свету (табл. 1).

Установлено, что каллусогенез зависит прежде всего от генотипа исходного растения. Наибольшая частота каллусогенеза была характерна для сортов Свежесть и Юбилей Москвы (72,5- 90,6%). Оба сорта такие показатели проявили на среде Хеллера. Ниже уровень каллусообразования отмечен у сортов Афродита и Орловское полесье. Образовавшиеся каллусные ткани (косвенный андрогенез) различались плотностью и цветом. В основном это были морфогенные каллусы плотной консистенции с бугристой поверхностью. Цвет их варьировал от белого до желтоватого. В единичных случаях встречались каллусы рыхлые, водянистые, молочно- белого цвета.

Таблица 1

**Эффективность каллусообразования пыльников яблони в культуре *in vitro*, 2007 г.**

Сорт	Питательная среда	Количество эксплантированных пыльников	Частота каллусообразования, %
<b>В темноте</b>			
Афродита	МС	373	46,9±1,3
	Хеллера	364	65,9±0,9
Свежесть	МС	296	56,4±1,5
	Хеллера	353	71,4±1,2
Орловское полесье	МС	379	38,4±0,9
	Хеллера	363	67,3±1,2
	МС (П <sub>4</sub> )*	341	26,9±1,1
	МС (П <sub>6</sub> )**	365	40,0±1,0
Юбилей Москвы	МС	391	49,4±1,3
	Хеллера	404	72,5±0,4
	МС (П <sub>4</sub> )*	391	31,0±1,0
	МС (П <sub>6</sub> Г)	385	26,0±0,9
<b>На свету</b>			
Орловское полесье	МС	360	25,8±0,9
	МС (П <sub>4</sub> )*	249	18,9±0,7
	МС (П <sub>6</sub> )**	296	20,3±0,8
Юбилей Москвы	МС	388	31,7±1,1
	МС (П <sub>4</sub> )*	422	13,0±0,8
	МС (П <sub>6</sub> Г)	365	14,5±0,7

Примечание: МС (П<sub>4</sub>)\* - среда Мурасиге-Скуга с добавлением 4 мг/л пиклорама, МС (П<sub>6</sub>)\*\* - среда Мурасиге-Скуга с добавлением 6 мг/л

Использование пиклорама, как стимулятора каллусообразования, показало

его значительную активность как в темноте, так и на свету (табл. 2).

Таблица 2

**Эффективность каллусогенеза у пыльников яблони в присутствии пиклорама (%)**

Сорт	Питательная среда	Условия культивирования	
		термостат	светокomната
<b>2005 г.</b>			
Орловское полесье	МС П <sub>2</sub> *	50,2±1,5	14,5±0,7
	МС П <sub>4</sub> **	39,8±0,9	22,6±1,0
Юбилей Москвы	МС П <sub>2</sub>	26,6±1,1	11,3±0,5
	МС П <sub>4</sub>	39,1±1,0	21,3±0,9
<b>2006 г.</b>			
Орловское полесье	МС П <sub>2</sub>	57,0±1,3	12,9±0,7
	МС П <sub>4</sub>	82,0±0,5	58,1 ±0,7
Юбилей Москвы	МС П <sub>2</sub>	39,7±0,9	12,5±0,8
	МС П <sub>4</sub>	83,3±0,4	74,9±0,5
<b>2007 г.</b>			
Орловское полесье	МС П <sub>4</sub>	26,9±1,1	18,9±0,7
	МС П <sub>6</sub> ***	40,0±1,0	20,3±0,8
Юбилей Москвы	МС П <sub>4</sub>	31,0±1,0	13,0±0,8
	МС П <sub>6</sub>	26,0±0,9	14,5±0,7

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

Каллус, сформированный в темноте на среде с пиклорамом, плотный, бугорчатый, молочный или белый и внешне больше напоминает скопление меристематических зон, чем растущую неорганизованную рыхлосвязанную каллусную ткань. При перенесении такого каллуса на свет половина его поверхности зеленеет в 99 из 100 случаев, тогда как без пиклорама - от 32% до 51 % в зависимости от сорта.

Каллус, сформированный на свету, весь изначально имеет интенсивно зеленую или зеленовато-белую окраску, более плотный, чем в темноте, с четко очерченными границами зон, напоминающими меристематические.

Каллус, образованный 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 отрицательных особенностей у каллусной ткани, образованной на среде с пиклорамом, не отмечалось.

Для выявления возможности морфогенеза каллусные ткани пассировали на среду МС (соотношение ауксин : цитокинин 1:3). При этом на каллусе всего лишь одного сорта Свежесть были получены корни. При увеличении соотношения ауксин: цитокинин (НУК:БАП, кинетин) в три раза получены корни на каллусе у сорта Афродита. При замене цитокинина (НУК) пиклорамом получены корни на каллусе сорта Свежесть. Ризогенез у обоих сортов протекал внутри каллусной ткани.

**Выводы.** Результаты исследований показали, что развитие пыльников иммунных к парше сортов яблони проходило по пути косвенного андрогенеза. Интенсивность каллусогенеза определялась генотипом исходного сорта, искусственной питательной средой и экзогенными стимуляторами роста. Использование препарата под названием пиклорам показало его значительную ауксиновую активность в процессе каллусообразования из пыльников яблони как на свету, так и в темноте.

В каллусных тканях сортов Свежесть и Афродита индуцированы корни. Исследования будут в этом направлении продолжены, поскольку вышеизложенное дает надежду в перспективе получить

другие морфогенные образования, а также растения-регенеранты.

#### Использованная литература:

1. Blakeslee A., Beeling J., Farnham M. E., Berger A. D. / Science. - 1922. - Vol. 55. - P. 646-647.
2. Карпеченко, Г. Д. Теоретические основы селекции растений. / Г. Д. Карпеченко. - М.-Л: Сельхозгиз, 1935. - Т. 1.-434 с.
3. Навашин, М. С. Ботанический журнал. / М. С. Навашин. - 1934. - Т. 19. - Вып. 4. - С. 640-641.
4. Гапоненко, А. К. Перспективы использования культуры клеток растений в селекции. / А. К. Гапоненко. // Успехи современной генетики. - М.: Наука, 1987.- Вып. 14.-С. 64-74.
5. 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.
6. Hu Han. Crop improvement by anther culture in genetics : New frontiers. // Proc. XV Intern. Congr. Genet. New Delhi. - 1984. - P. 77-85.
7. Тырнов, В. С. Использование гаплоидов в генетических исследованиях. / В. С. Тырнов // Гаплоидия и селекция. -М.: Наука, 1976.-С. 140-151.
8. Dayuan Wang, Yao-lin Gui and Jiang- San Sun. Tissue Culture of Fruit Crops in China. // Hortscience. - 1988. - Vol. 23. - № 6. - P. 962-965.
9. 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. // C. R. Acad. Sci. - 1972. - Vol. D 274, №18, - P. 2574-2577.
10. 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.
11. Collins G. Use of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissue cultures. / G. Collins, W. Vion, G. Phillips. // Crop. Sci. - 1978. -Vol. 18,- № 2 - P. 286-288.

**УДК 634.11:581.143.6**

**Джафарова В. Є.** Калусо- и морфогенез пиляків імунних до парші сортів яблуні (*Malus domestica* Borkh.) в культурі in vitro //Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. - К., 2008. - № 7.

Надано результати культивування ізольованих пиляків яблуні імунних до парші сортів. Наведено особливості формування калуса з використанням пікло- раму і можливості морфогенеза.

Ключові слова: сорти яблуні, ізолювані пиляки, культивування пиляків, калусогенез, екзогенні стимулятори, індуковані корені.

**УДК 634.11:581.143.6**

**Джафарова В. Е.** Каллусо- и морфогенез пыльников иммунных к парше сортов яблони (*Malus domestica* Borkh.) в культуре in vitro //Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. - К., 2008. -№ 7.

Изложены результаты культивирования изолированных пыльников им

мунных к парше сортов яблони орловской селекции. Показано, что развитие пыльников исследуемых сортов яблони проходит по пути косвенного андрогене- за. Интенсивность каллусогенеза определяется генотипом сорта, видом питательной среды и экзогенных стимуляторов роста. В каллусных тканях сортов Свежесть и Афродита индуцированы корни. Препарат пиклорам проявляет значительную ауксиновую активность в процессе каллусообразования из пыльников яблони как на свету, так и в темноте.

**УДК 634.11:581.143.6**

**Jafarova V.** Anther callusogenesis and morphogenesis of immune to scab apple varieties (*Malus domestica* Borkh.) in culture in vitro // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. - К., 2008. - №7.

The results of cultivating of isolated apple anthers of immune to scab varieties are described. The peculiarities of callus formation using picloram are shown.