


ОСОБЕННОСТИ ПЕРВОГО ЭТАПА КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ИММУННЫХ СОРТОВ ЯБЛОНИ

Л.В. Ташматова , к.с.-х.н.
О.В. Мацнева, н.с.
В.В. Шахов, м.н.с., 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

На приживаемость эксплантов оказывают влияние следующие факторы: стерилизующие агенты, сроки введения в стерильную культуру, исходный материал, окисление фенолами питательной среды и эксплантов, состав питательной среды. Исследования проводили на базе лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК в 2016...2018 гг. Объектами исследования служили иммунные сорта яблони – Болотовское, Имрус, Орловское полесье, Кандиль орловский. Культивирование эксплантов проводили на питательных средах Мурасиге-Скуга и Кворина-Лепуавра на фоне 0,5 мл/л 6-БАП. Продолжительность культивирования три недели. Основной целью настоящих исследований было изучение оптимальных условий для высокого выхода стерильных жизнеспособных эксплантов яблони. Изучали влияние стерилизующих агентов, сроков введения в культуру *in vitro* и исходного материала на приживаемость и развитие эксплантов. При изучении влияния 0,1% растворов мертиолята и сулемы на выход стерильных и жизнеспособных эксплантов значительных различий между двумя стерилизующими агентами не выявили. В ходе эксперимента установили высокую приживаемость эксплантов при изоляции в период активного роста (июнь). Выявили, что наилучший исходный материал – верхушка растущего побега. Для снятия отрицательного влияния фенольных соединений в питательную среду добавляли 10 мл/л аскорбиновой кислоты, а так же экспланты выдерживали в 0,3% растворе аскорбиновой кислоты в течение всего времени изоляции. Выделение фенолов было 100%. При повторной пересадке на свежую питательную среду окисления не наблюдали. Это повысило выход жизнеспособных эксплантов. У сорта Кандиль орловский получено 97,7% эксплантов, у сорта Орловское полесье – 86,7%, у сорта Болотовское – 79,6%, у сорта Имрус – 80,0%.

Ключевые слова: яблоня, экспланты, клональное микроразмножение, фенольные соединения, стерилизующий агент, контаминация, питательная среда

FEATURES OF THE FIRST STAGE OF CLONAL MICROPROPAGATION OF IMMUNE APPLE VARIETIES

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

O.V. Matzneva, research worker

V.V. Shakhov, junior research worker, postgraduate student

T.M. Khromova, junior research worker

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

Abstract

The following factors: sterilizing agents, the period of introduction into a sterile culture, the source material, phenol oxidation of the nutrient medium and explants, the composition of the nutrient medium are influenced on the survival rate of explants. The studies were carried out in the biotechnology laboratory at VNIISPK in 2016—2018. Immune apple varieties Bolotovskoye, Imrus, Orlovskoye Polesie and Candil Orlovsky were used as objects of studies. The explants cultivation was conducted on nutrient media Murasige-Skuga and Kvorina-Lepuavra on the background of 0.5 mg/l 6-BAP. The duration of cultivation is three weeks. The main goal of the research was to study optimal conditions for high yield of sterile viable apple explants. The influence of sterilizing agents, periods of introduction to culture *in vitro* and source material on the survival rate and development of explants was studied. When studying the influence of 0.1% solutions of mertiolate and sublimate on the yield of sterile and viable explants, no significant differences between two sterilizing agents were revealed. The high survival rate of explants was determined in isolation during the period of active growth (June). It was found that the top of the growing shoot was the best of the source material. To avoid the negative influence of phenolics, 10 ml/l of ascorbic acid were added to the nutrient medium as well as explants were kept in 3% solution of ascorbic acid during the whole time of isolation. Secretion of phenols was 100%. When re-transplanting to a fresh nutrient medium, oxidation was not observed. This increased the yield of viable explants. 97.7% of explants were obtained in Candil Orlovsky, 86.7% – in Orlovskoye Polesie, 79.6% – in Bolotovskoye and 80.0% – in Imrus.

Key words: apple, explants, clonal micropropagation, phenolics, sterilizing agent, contamination, nutrient medium

Введение

Существенную роль в успешном проведении процесса клонального микроразмножения растений играет оптимизация этапа введения в культуру, так как он является наиболее трудоемким. При переводе растения из состояния *in vivo* в *in vitro* исследователи сталкиваются с такими проблемами, как инфицированность эксплантов и некроз тканей, вызванных действием стерилизующих агентов и фенольным окислением питательной среды и эксплантов, а так же выбор сроков введения и состава питательных сред (Высоцкий, 2011).

На выбор того или иного периода изоляции апексов оказывает влияние состояние эксплантов, которые должны быстро «включиться» в рост. Как правило, в качестве

исходного материала берут одревесневшие побеги в фазе начала роста (март – начало апреля) и зеленые побеги в фазе активного роста (конец мая – начало июня) (Матушкина, Пронина, 2008), а так же однолетние одревесневшие побеги в фазе второй волны роста (август) (Долгих, 2004).

Приживаемость эксплантов связана с правильным выбором оптимального стерилизующего агента, который не повреждал бы растительные ткани и максимально снижал уровень контаминации. Выбор агента и его концентрация зависит от вида растения. Для стерилизации эксплантов яблони используют 0,1% раствор диацида, 6% раствор гипохлорида кальция, 30% раствор «Белизны» (Шевелуха, 1998, Кухарчик и др., 2004).

Часто при введении растений в культуру возникает другая довольно серьезная проблема – ингибирование ростовых процессов экспланта токсическими веществами (фенолами), которые выделяются в среду в результате травмы при изолировании. Для снятия отрицательного воздействия фенолов растительные ткани обрабатывают стабилизирующими веществами – 0,2% раствором сульфита натрия с аскорбиновой кислотой, 0,5% раствором ДИЕКА. Для яблони этот вопрос особенно актуален, т. к. экспланты этой культуры выделяют большое количество фенолов.

На приживаемость эксплантов оказывают влияние еще два фактора – размер экспланта и состав питательной среды (Леонтьев-Орлов, 1988, Леонова, 2013). Для яблони рекомендуют питательные среды Мурасиге-Скуга, Кворина-Лепуавра, Гамборга и другие (Минаев, 2003, Кухарчик и др., 2004).

В связи со всеми перечисленными проблемами, возникающими на первом этапе клонального микроразмножения, целью настоящих исследований было изучение оптимальных условий на этапе введения для высокого выхода стерильных жизнеспособных эксплантов сортов яблони.

Материалы и методика исследований

Исследования проводили на базе лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК в 2016...2018 г. Объектами исследования служили иммунные сорта яблони – Болотовское, Имрус, Орловское полесье, Кандиль орловский. Материал был предоставлен сотрудниками лаборатории сортоизучения семечковых культур. В качестве исходного материала брали: щитки с одревесневших побегов в период выхода из состояния покоя (март – апрель) и в период затухания роста (конец августа), а так же верхушки растущих побегов в период активного роста (июнь). Побеги, взятые в весенний период, ставили на отрастание.

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 (2004).

Стерилизацию эксплантов проводили по схеме:

- Промывка щитков или верхушек побегов под проточной водой – 1 час;
- Обработка щитков или верхушек побегов 70% спиртом – 10 с.;
- Промывка щитков или верхушек побегов автоклавированной дистиллированной водой – 10 мин.;
- Промывка 0,1% раствором мертиолята или 0,1% раствором сулемы – 10 мин.;
- Промывка автоклавированной дистиллированной водой – 3 раза по 5 мин.

После стерилизации экспланты изолировали в операционной комнате с использованием бинокуляра МБС-10 и высаживали на питательные среды Мурасиге-Скуга и Кворина-Лепуавра на фоне 6-БАП – 0,5 мг/л (нулевой пассаж- R_0). Для снятия

отрицательного влияния фенольных соединений использовали антиоксидантную смесь по рекомендациям Атрощенко (2001) или добавляли в питательную среду 10 мг/л аскорбиновой кислоты, а во время изоляции выдерживали экспланты в 0,3% растворе аскорбиновой кислоты.

Через три недели культивирования на R_0 экспланты пересаживали на среду QL с содержанием 6-БАП 0,8 мг/л (R_1). Приживаемость выражали в процентном соотношении жизнеспособных, инфицированных и погибших вследствие некроза апексов к общему количеству введенных эксплантов.

Результаты и их обсуждение

Как показали результаты наших исследований, на уровень контаминации оказывают влияние три фактора – стерилизующий агент, срок введения эксплантов в культуру и исходный материал. В 2016...2017 гг. экспланты изолировали в три периода – период выхода из покоя (март – апрель), активного роста (июнь) и затухания роста (август). В качестве стерилизующего агента использовали 0,1% раствор мертиолята. Для введения использовали почки (верхушечная и боковая) и верхушки растущих зеленых побегов (рисунок 1). Размер изолированного экспланта 1...2 мм с 2...3 примордиальными листочками (рисунок 2).

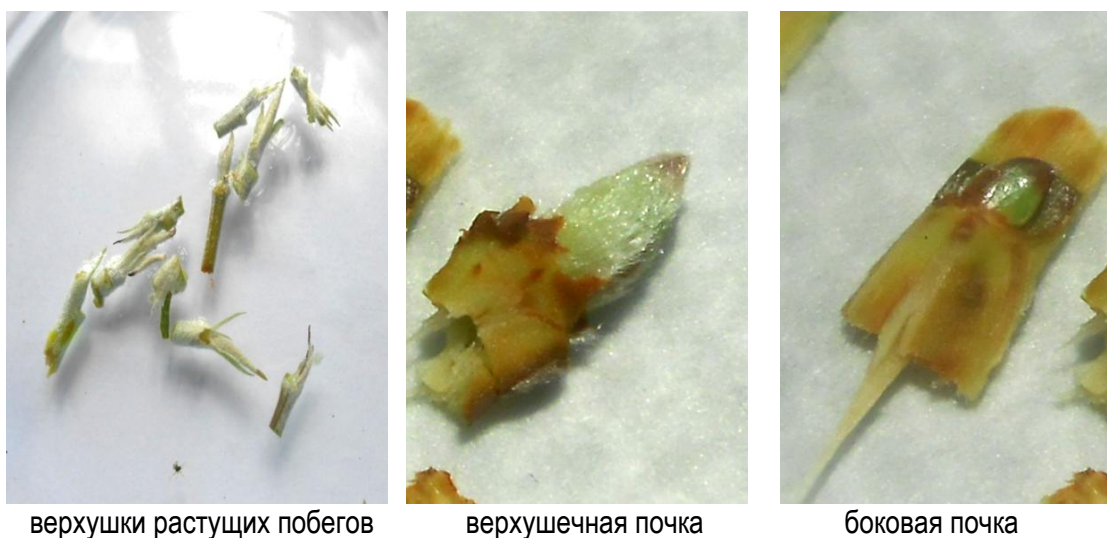


Рисунок 1 – исходный материал

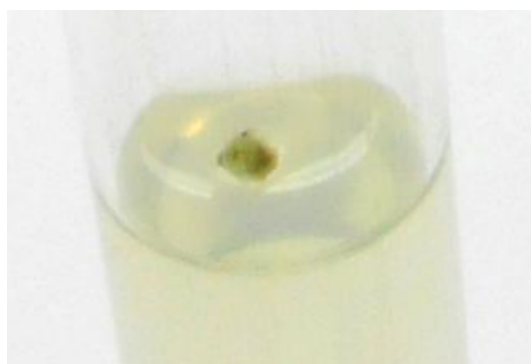


Рисунок 2 – Изолированный эксплант яблони

Уровень контаминации различался по срокам введения и между сортами.

Почки были достаточно мелкие, особенно в период затухания роста. Их было трудно освободить от кроющих чешуй. Возможно, стерилизующий агент плохо проникал внутрь почки и именно этим можно объяснить высокую инфицированность эксплантов яблони. Наибольший выход неинфицированных эксплантов был отмечен в период активного роста. Наименьшей инфицированностью апексов отличались сорта Орловское полесье и Болотовское. Среди использованных сортов наибольшей зараженностью эксплантов отличался сорт Кандиль орловский независимо от срока введения (таблица 1).

Таблица 1 – Контаминация эксплантов яблони в различные сроки введения в культуру *in vitro*, 2016...2017 гг., %

Сорт	Сроки введения в культуру <i>in vitro</i>		
	Выход из состояния покоя (март – апрель)	Активный рост (июнь)	Затухание роста (август)
Болотовское	48,80	1,50	100,00
Имрус	44,70	4,05	80,00
Кандиль орловский	66,05	18,80	100,00
Орловское полесье	47,00	0,00	14,10

В связи с высоким уровнем контаминации в августе, в 2018 годы использовали два срока введения – период выхода из покоя (март – апрель) и активный рост (июнь). Для стерилизации эксплантов использовали 0,1% раствор мертиолята и 0,1% раствор сулемы. Полученные результаты не показали значительных различий между двумя препаратами. Большее значение имел срок введения в культуру. Так же, как и в предыдущие годы, наибольшее число стерильных эксплантов было получено в период активного роста (таблица 2).

Таблица 2 – Контаминация эксплантов яблони в различные сроки введения в культуру *in vitro*, 2018 г., %

Сорт	Выход из состояния покоя (март – апрель)		Активный рост (июнь)	
	мертиолат	сулема	мертиолат	сулема
Болотовское	90,0	90,8	4,2	10,2
Имрус	33,3	20,8	2,5	0
Кандиль орловский	84,2	83,3	0	0
Орловское полесье	96,7	97,5	2,3	2,2

Полученные данные показывают достаточно высокий выход жизнеспособных эксплантов, введенных культуру *in vitro* в летний периоды. Наибольший выход жизнеспособных эксплантов наблюдали у сорта Болотовское.

Однако более детальный анализ этих периодов показал, что большая часть эксплантов, введенных в июне, в дальнейшем гибнет от окисления фенолами. У эксплантов сортов Имрус и Кандиль орловский, введенных в августе, приживаемость была равна нулю (таблица 3).

У прижившихся эксплантов наблюдаем рост примордиальных листочков, а меристема в рост не трогается, что вероятно связано с физиологическим состоянием покоя материнского растения.

Таблица 3 – Приживаемость эксплантов на этапе введения в различные сроки введения в культуру, 2016...2017 гг., %

Сорт	Сроки введения в культуру <i>in vitro</i>		
	Выход из состояния покоя (март - апрель)	Активный рост (июнь)	Затухание роста (август)
Болотовское	26,3	93,0	нет данных
Имрус	64,4	83,3	0,0
Кандиль орловский	51,0	66,5	0,0
Орловское полесье	46,1	85,7	65,6

В течение трех лет при введении в культуру *in vitro* наблюдали окисление питательной среды фенольными соединениями, что вызывало гибель значительного числа эксплантов.

В 2016...2017 гг. для снижения фенольного окисления экспланты яблони перед введением обрабатывали антиоксидантной смесью, рекомендованной Г. П. Атрощенко (2001) (3 г/л аскорбиновой кислоты + ДИЕКА 1,0 г/л + ЭДТА 1,0 г/л + глицин 5,5 г/л). Однако, положительных результатов это не дало. Сто процентное окисление среды наблюдали у эксплантов, введенных в период активного роста, у всех сортов. Пересадка на новую среду окисления не сняла, и на следующий день оно проявлялось снова. В результате чего снижался уровень приживаемости эксплантов. У эксплантов, введенных в период начала роста, окисление в среднем составило – 73,0%, в период окончания роста – 57,4%. 100% окисление было только у сортов Имрус и Кандиль орловский. Экспланты так же пересаживали один раз на новую среду, после чего окисление вновь не проявлялось.

В 2018 г. низкий выход жизнеспособных эксплантов в весенний период связан с высокой инфицированностью апексов (таблица 2). К третьему пассажиру коэффициент размножения у сортов достиг: Кандиль орловский – 2,7; Орловское полесье – 2,3; Болотовское – 2,25; Имрус – 2,8; Гирлянда – 4,6; Приокское – 2,9; Поэзия – 2,0.

Для снятия отрицательного воздействия фенолов в питательную среду добавляли аскорбиновую кислоту в количестве 10 мг/л, а так же выдерживали экспланты в 0,3% растворе аскорбиновой кислоты в течение всего времени их изоляции. Окисление среды это не сняло, однако использование высокой концентрации аскорбиновой кислоты, возможно, снизило отрицательное воздействие фенолов, так как экспланты не желтели, а сохраняли зеленую окраску. При быстрой пересадке (через 2...18 часов в зависимости от интенсивности окисления) эксплантов на новую среду повторного окисления не наблюдали. Это способствовало дальнейшему развитию эксплантов.

В 2018 г. в период активного роста наибольшей приживаемостью отличались сорта Кандиль орловский и Орловское полесье.

При изучении влияния 0,1% растворов мертиолат и сулемы на выход стерильных и жизнеспособных эксплантов значительных различий между двумя стерилизующими агентами не выявили (таблица 4).

Таблица 4 – Приживаемость эксплантов на этапе введения в различные сроки введения в культуру, 2018 г., %.

Сорт	Выход из состояния покоя (март–апрель)		Активный рост (июнь)	
	Мертиолат	Сулема	Мертиолат	Сулема
Болотовское	9,2	9,2	74,5	79,6
Имрус	16,7	37,5	80,0	74,4
Кандиль орловский	8,3	12,5	97,6	97,7
Орловское полесье	0,0	0,0	81,4	86,9

Через три недели культивирования апекс трогался в рост (рисунок 3).



Кандиль орловский

Болотовское

Рисунок 3 – Развитие эксплантов яблони через три недели после изоляции

Изолированные экспланты высаживали на питательные среды Мурасиге-Скуга (МС) и Кворинв-Лепуавра (QL) с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП. Более высокая приживаемость и более интенсивное развитие меристем наблюдали на среде QL. Через три недели экспланты пересаживали на питательную среду QL, содержащую 6-БАП в количестве 0,8 мг/л.

На основе изложенного можно сделать выводы:

1. На приживаемость эксплантов яблони значительное влияние оказывают сроки введения в культуру и исходный материал;
2. Наилучшим периодом введения в культуру *in vitro* для сотов яблони является период активного роста (июнь);
3. Наилучшим исходным материалом яблони служат верхушки растущих побегов;
4. Для снятия отрицательного воздействия фенолов рекомендуется увеличить концентрацию аскорбиновой кислоты до 10 мг/л в составе питательной и выдерживать экспланты во время изоляции в 0,3% растворе аскорбиновой кислоты.

Литература

1. Атрощенко Г.П., Костицын В.В., Наделюев А.А. Рекомендации по производству оздоровленного посадочного материала земляники. – СПб: СПбГАУ, 2001. 13 с.
2. Высоцкий В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве // Плодоводство и ягодоводство России. 2011. Т.26. С. 3-10.
3. Долгих С.Г. Размножение и выращивание яблони в корнесобственной культуре // Садоводство и виноградарство. 2004. №5. С. 14-17.
4. Клональное микроразмножение плодовых и ягодных культур: учебное пособие. Воронеж: ВГАУ. 2003. 80с.
5. 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.
6. Леонтьев-Орлов О.А., Трушечкин В.Т., Высоцкий В.А. Особенности культивирования изолированных апексов яблони / Плодоводство в Нечерноземной полосе : сб. науч. тр. НИЗИСНП. 1988. С. 21-30.
7. Леонова Н.В. Оптимизация состава питательной среды при размножении земляники садовой *in vitro* / Вестник БГСХА. № 1. 2013. С. 45-48.

8. Матушкина О.В., Пронина И.Н. Технология клонального микроразмножения яблони и груши (методические рекомендации). – Мичуринск: ВСТИСП, 2008. 32с.
9. Минаев В.А., Верзилин А.В., Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение слаборослых клоновых подвоев яблони селекции МГАУ // Садоводство и виноградарство. 2003. №5. С. 12-13.
10. 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. : под ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высшая школа, 1998. 416 с.

References

1. Atroshchenko, G.P., Kostitsyn, V.V. & Nedelyuev, A.L. (2001). *Recommendations for production of healthy planting material of strawberry*. Saint-Petersburg: Saint-Petersburg State Agrarian University. (In Russian).
2. Vysotskiy, V.A. (2011). Biotechnological methods in up-to-date gardening. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 26, 3-10. (In Russian, English abstract).
3. Dolgikh, S.G. (2004). Propagation and growing of apple trees in true-rooted culture. *Horticulture and viticulture*, 5, 14-17. (In Russian).
4. Anonymous (2003). *Clonal micro propagation of fruit and berry crops*. Tutorial. Voronezh: Voronezh State Agrarian University. (In Russian).
5. Kukharchik, N.V., Kastrikskaya, M.S., Semenas, S.E, Kolbanova, E.V., Krasinskaya, T.A., Volosevich, N.N., Solovei, 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).
6. Leontiev-Orlov, O.A., Trushechkin, V.T. & Vysotsky, V.A. (1988). Features of cultivation of isolated apple apexes. In *Fruit-growing in the Non-Chernozem zone*: NIZISNP Col. (pp. 21-30). (In Russian).
7. Leonova, N.V. (2013). Optimization of the nutrient medium composition during strawberry propagation in vitro. *Vestnik of the Bryansk State Agricultural Academy*, 1, 45-48. (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. Minaev, V.A., Verzilin, V.A. & Vysotsky, V.A. (2003). Clonal micro propagation of low-sized clone apple rootstocks of MGAU breeding. *Horticulture and viticulture*, 5, 12-13. (In Russian).
10. Shevelukha, V.C., Kalashnikova, E.A., Degtyarev, S.V., Kochieva, E.Z., Prokofiev, M.I., Novikov, N.N., Kovalev, V.M., & Kalashnikov, D.V. (1998). *Agricultural biotechnology*. Moscow: High School. (In Russian).