

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЖРОДОВЫХ ГИБРИДОВ ПЛОДОВЫХ СЕМЕЧКОВЫХ РАСТЕНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ И ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ *in vitro*

Р.В. ПАПИХИН, С.А. МУРАТОВА

С использованием методов биотехнологии получены гибридные растения из семян, образовавшихся при межродовой гибридизации семечковых плодовых культур. Представлены результаты исследований по переводу на полиплоидный уровень отдаленных гибридов семечковых плодовых культур. Изучено действие амитотиков — аценафтена и колхицина на развитие растений в условиях *in vitro*. Проведен анализ морфологических изменений побегов и устьичного аппарата листьев растений, подвергшихся действию полиплоидизирующих агентов. Подсчет числа хромосом в точках роста корешков растений, полученных на питательных средах с 0,001 и 0,01 % аценафтена или колхицина, подтвердил изменение пloidности гибридов.

Ключевые слова: межродовая гибридизация, семечковые плодовые культуры, культура тканей *in vitro*, индукция полиплоидии, амитотики, цитологический анализ.

Keywords: intergeneric hybridization, seed fruit, tissue culture *in vitro*, polyploidy induction, amitotic, cytological analysis.

Отдаленная гибридизация привлекала многих известных селекционеров прежде всего возможностью включения в селекционный процесс диких предков культурных растений, обладающих ценными свойствами: иммунитетом к заболеваниям, исключительной засухоустойчивостью, зимостойкостью, высоким содержанием биологически активных веществ. Все эти качества приобретают первостепенную актуальность в связи с ухудшением экологической обстановки и климатическими изменениями.

Наибольшие трудности при межвидовой и межродовой гибридизации связаны с преодолением репродуктивной изоляции разных видов. При отдаленных скрещиваниях гибридные зародыши могут погибнуть как на самых ранних стадиях развития, так и позже. Результативность таких скрещиваний низка, завязавшиеся единичные семена характеризуются пониженной всхожестью в естественных условиях. Использование методов культуры тканей *in vitro* позволяет получить жизнеспособные межродовые гибриды из семян с недостаточно развитыми зародышами, преодолеть влияние негативных факторов на всхожесть и сократить период покоя семян.

Методы эмбриокультуры успешно использовались при межвидовой и межродовой гибридизации косточковых и семечковых плодовых культур. Культивирование изолированных зародышей на стерильных питательных средах повышает их жизнеспособность и способствует прорастанию даже дегенерирующих эмбрионов. Исследования, ведущиеся в этом направлении, достаточно подробно описаны в обзоре М.С. Кастрицкой (1).

В то же время многолетние работы по получению гибридных генотипов и дальнейшему использованию их в селекционной практике нередко заходят в тупик из-за стерильности отдаленных гибридов, причиной которой оказываются многочисленные нарушения в макро- и микроспорогенезе (2). Поскольку у отдаленных гибридов геном, как правило, разбалансирован, то наиболее действенный способ, позволяющий использовать этот ценный генетический материал в селекционной работе, — перевод их на полиплоидный уровень с помощью амитотиков. Полиплоидия облегчает гибридизацию и интрогрессию между видами, даже полностью изолированными на диплоидном уровне, и служит эффективным средством восстановления плодовитости отдаленных гибридов. В результате кратного увеличения числа хромосом изменяется степень выраженности признаков, характер наследования, пластичность формы, ее адаптационные возможности. Полиплоидия — достаточно

широко распространенная в природе геномная мутация, которая может дать дополнительные возможности для выживания организма в экстремальных условиях среды (3). С 1830-х годов и до настоящего времени основным источником получения полиплоидных растений остается обработка меристемных тканей полиплоидизирующими агентами (4-6). Наиболее широко и успешно для этих целей используются колхицин (алкалоид растительного происхождения) и аценафтен (продукт переработки каменноугольной смолы). Методы полиплоидизации растительного материала в естественных и лабораторных условиях с использованием семян, растущих побегов и укорененных черенков достаточно широко применялись при отдаленной гибридизации ягодных и плодовых культур, однако для условий *in vitro* они практически не адаптированы и требуют серьезных модификаций. Так, представляет интерес разработка способов предварительного отбора потенциальных полиплоидов и цитологическое изучение полученных форм с учетом особенностей микрорастений.

Цель наших исследований заключалась в получении отдаленных гибридов с использованием культуры тканей и разработке эффективного метода полиплоидизации *in vitro* у плодовых семечковых растений.

Методика. В культуру *in vitro* вводили зародыши, полученные при отдаленных скрещиваниях семечковых растений: сорт Памяти Яковлева (груша) × сорт Дискавери (яблоня), сорт Памяти Яковлева (груша) × форма А1 (яблоня), сорт Северянка (груша) × сорт Дискавери (яблоня), форма А1 (яблоня) × сорт Северянка (груша), сорт Богатырь (яблоня) × сорт Августовская роса (груша), сорт Богатырь (яблоня) × сорт Бере зимняя Мичурина (БЗМ) (груша), сорт Антоновка (яблоня) × сорт БЗМ (груша), сорт Пепин шафранный (яблоня) × сорт Рулго (айва). Семена выделяли из созревших плодов, предварительно выдержанных 2-3 мес в хранилище, аккуратно снимали с них оболочки и извлекали зародыши вместе с семядолями. Экспланты стерилизовали 0,1 % раствором сулемы в течение 1 мин, трижды промывали стерильной дистиллированной водой и высаживали в пробирки на искусственную питательную среду. Образовавшиеся гибридные проростки срезали и помещали на среды размножения (каждому гибридному генотипу присваивали номер). Межродовой рябино-грушевый гибрид № 136 из коллекции Всероссийского НИИ генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина вегетативными почками вводили в стерильную культуру и размножали. Для культивирования гибридных зародышей и почек использовали минеральную основу питательных сред Мурасиге-Скуга (MS) (7) и Кворина-Лепорье (QL) (8). На этапах введения и микро размножения полученных проростков в среду добавляли регуляторы роста растений: 6-бензиламинопурин (6-БАП) — 1-2 мг/л, гибберелловую кислоту (ГК) — 0,2-1 мг/л, β-индолил-3-масляную кислоту (ИМК) — 0,1-0,2 мг/л или β-индолилуксусную кислоту (ИУК) — 0,2-0,5 мг/л. На этапе укоренения концентрацию макросолей и сахарозы в питательной среде снижали вдвое. В качестве индуктора ризогенеза применяли ИМК — в составе среды укоренения (0,5-1 мг/л) или в виде водного раствора (50 мг/л), используемого для предварительного замачивания оснований микропобегов в течение 16-20 ч. В последнем случае микрочеренки высаживали на среду укоренения, не содержащую регуляторов роста. В обоих вариантах контролем служили микропобеги, укореняемые на безгормональной среде. Растения культивировали при температуре воздуха 26±2 °С, освещенности 2000-2500 лк и фотопериоде 16 ч/8 ч (день/ночь). Также провели опыты по регенерации адвентивных побегов из изолированных участков семядолей непроросших зародышей и каллуса. Предварительно каждую семядолю разрезали поперек центральной жилке на 3 части, полученные сегменты помещали на среду регенерации на основе солей MS. Для индукции морфогенеза применяли 6-БАП (5 мг/л) в сочетании с одним из ауксинов (ИМК, ИУК или НУК). Соотношение цито-

кинин:ауксин составляло 10:1 и 25:1. Экспланты на средах регенерации культивировали в темноте при температуре 24 °С в течение 12 нед (3 пассажа по 4 нед каждый). Побеги-регенеранты, образовавшиеся на семядолях, срезали и включали в систему клонального микроразмножения гибридов. Укорененные *in vitro* растения в мае—июне высаживали в грунт в малогабаритные пленочные теплицы с воздушно-капельным орошением. Под пленочным покрытием растения находились 1-1,5 мес, затем пленку снимали; осенью выжившие растения пересадили в питомник (Всероссийский НИИ генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина).

На рябино-грушевом гибриде № 136 и гибридной форме № 14/4 (груша сорта Памяти Яковлева × яблоня сорта Дискавери) матроклинного типа отработывали способы перевода растений на полиплоидный уровень в условиях *in vitro*. Апексы культивируемых *in vitro* побегов (0,3-0,5 см) высаживали на среды размножения с минеральной основой среды QL, содержащие 6-БАП (2 мг/л), ГК (0,5 мг/л), ИМК (0,2 мг/л), витамины по прописи MS, гидролизат казеина (250 мг/л), полиплоидизирующий агент (колхицин или аценафтен) в концентрации 0,001 % (10 мг/л) и 0,01 % (100 мг/л). Контролем служили побеги, культивируемые на среде того же минерального и гормонального состава, но не содержащей амитотика. Поскольку аценафтен малорастворим в воде (менее чем 0,002 %), он был предварительно смешан с касторовым маслом. Экспланты находились на средах с полиплоидогенными веществами в течение 6 нед, после чего их пересаживали на среду размножения аналогичного состава, но не содержащую амитотиков. Каждый микропобег, полученный на средах с аценафтенем и колхицином, рассматривали как независимую генетическую линию. После достижения побегами длины 1,5 см их укореняли. Предварительный отбор потенциальных полиплоидов осуществляли посредством цитологического изучения устьичного аппарата листьев опытных растений. Анализ размеров и подсчет числа устьиц на каждом побеге проводили, начиная с нижнего листа (1-й лист) микрочеренка и заканчивая самым верхним. Брели листья растений одного пассажа, культивируемых на одной питательной среде. После синхронизации деления в темновой фазе (12 ч) и предварительной обработки парадихлорбензолом (3 ч) меристемные участки корешков растений использовали для подсчета хромосом по методике Л.А. Фроловой с соавт. (9). Данные по каждому генотипу суммировали с учетом местоположения (номера) листа на побеге.

Статистическую обработку выполняли в программе Microsoft Excel.

Результаты. Введение в стерильную культуру семян, полученных в результате отдаленных скрещиваний, проводили в октябре—ноябре без предварительной стратификации, что существенно сократило время получения гибридных проростков. Зародыши проращивали на искусственной питательной среде, исключив этап выдерживания в течение нескольких месяцев при положительных низких температурах. В результате уже через 2-3 мес после сбора плодов практически во всех комбинациях скрещиваний в культуре *in vitro* были получены проросшие семена. Для увеличения общего числа гибридных побегов и сохранения форм, не образовавшихся на среде введения развитых побегов с корнями, все образовавшиеся проростки отделяли от семядолей и высаживали на среду размножения. При оптимальном соотношении цитокинина и ауксина на средах регенерации из семядолей непроросших зародышей дополнительно получили побеги-регенеранты в комбинациях: форма А1 (яблоня) × сорт Северянка (груша), сорт Антоновка (яблоня) × сорт БЗМ (груша), сорт Богатырь (яблоня) × сорт Августовская роса (груша), сорт Богатырь (яблоня) × сорт БЗМ (груша) (рис. 1, А). Наиболее эффективными оказались сочетания регуляторов роста 6-БАП (5 мг/л) с ИМК (0,5 мг/л) и 6-БАП (5 мг/л) с НУК (0,2 мг/л). В этих вариантах от 12,5 до 28,4 % эксплантов регенерировали побеги. Число побегов-регенерантов на один эксплант ($1/3$ часть семядоли) составляло 1-4 шт. Клональное

микроразмножение гибридов семечковых культур осуществляли по традиционной модели пролиферации пазушных побегов. На модифицированной питательной среде QL к концу 2-го пассажа получили жизнеспособные конгломераты из 2-5 почек и побегов в большинстве комбинаций скрещиваний (см. рис. 1, Б).

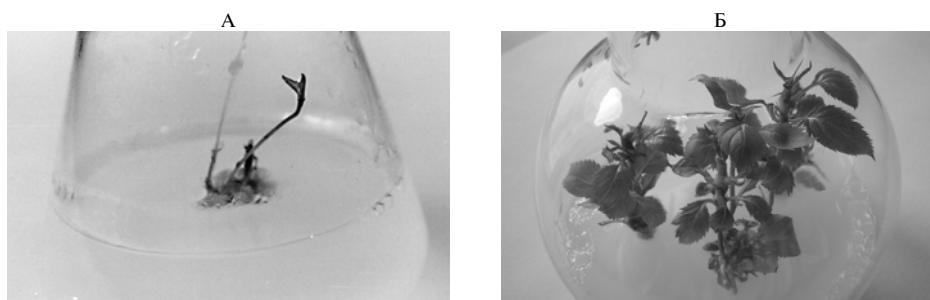


Рис. 1. Гибридные проростки, полученные в комбинации сорт Богатырь (яблоня) × сорт Бере зимняя Мичурина (груша): А — регенерация побегов из каллуса на участке семядоли, Б — клональное микроразмножение побегов.

На протяжении последующих 3 пассажей происходило постепенное повышение коэффициента размножения побегов. Максимальные значения (до 14 новых побегов за пассаж) отмечали у растений, полученных в комбинациях скрещиваний сорт Богатырь (яблоня) × сорт Августовская роса (груша) и сорт Памяти Яковлеву (груша) × форма А1 (яблоня) через 6 мес после введения в культуру. Изучаемые формы требовали регулярных (не реже чем через 5-6 нед) пересадок, в противном случае происходил некроз верхушек побегов, в особенности у гибридов, материнской формой для которых служила груша.

1. Эффективность культивирования *in vitro* и адаптации к нестерильным условиям у гибридов семечковых плодовых растений

Форма	Комбинация скрещивания	Доля эксплантов в культуре, %		Коэффициент размножения за 8-й пассаж	Частота, %	
		стерильных, живых	образовавшихся проростки		укоренения <i>in vitro</i>	адаптации <i>in vivo</i>
С1-8	Сорт Богатырь (яблоня) × сорт Августовская роса (груша)	68,2	10,4	7,8	60,8	23,5
К1-3	Сорт Богатырь (яблоня) × сорт Бере зимняя Мичурина (груша)	40,0	20,0	6,5	78,3	37,5
А1-4	Сорт Памяти Яковлеву (груша) × форма А1 (яблоня)	100	56,9	9,1	89,8	46,0
№ 14/4	Сорт Памяти Яковлеву (груша) × сорт Дискавери (яблоня)	74,3	48,7	8,4	74,5	74,6
№ 136	Сорт Титан (рябина) × смесь пыльцы груши	50,1	50,1	7,6	62,5	14,5

Отличительной особенностью полученных гибридов оказалась их достаточно низкая способность к укоренению в культуре *in vitro*. Укорененные побеги были получены только при использовании ауксина. В контрольных вариантах на средах без регуляторов роста укоренения микропобегов не происходило. Процесс образования корней в большинстве вариантов затягивался на 1,5-2 мес. Число образовавшихся корней обычно было невелико (от 1 до 4). Эффективность адаптации к естественным условиям, оцениваемая как доля выживших побегов от общего числа высаженных на укоренение в каждой комбинации, составила 14,5-74,6 % (табл. 1). Все выжившие после переноса в нестерильные условия растения успешно перезимовали в открытом грунте.

Культивирование гибридных форм на питательных средах, содержащих полиплоидогенные вещества, показало, что аценафтен в меньшей степени влиял на растительные ткани по сравнению с колхицином. Кроме того, интенсивность размножения и рост образовавшихся побегов зависели от генотипических особенностей культуры. Развитие микропобегов рябино-гру-

шевого гибрида на контрольной среде и на средах, содержащих 10 мг/л одного из амитотиков, характеризовалось сходными показателями (рис. 2). При концентрации аценафтена в среде 100 мг/л коэффициент размножения этого гибрида снизился до 4,8 по сравнению с 5,9 в контроле, в 2 раза уменьшилась средняя длина образовавшихся побегов и доля побегов длиной более 1,5 см. Влияние колхицина оказалось гораздо существеннее. При концентрации 100 мг/л в 30-40 % случаев происходила полная или частичная гибель меристем с формированием каллуса вместо побегов, резко снижалось формирование новых пазушных побегов и замедлялся их рост.

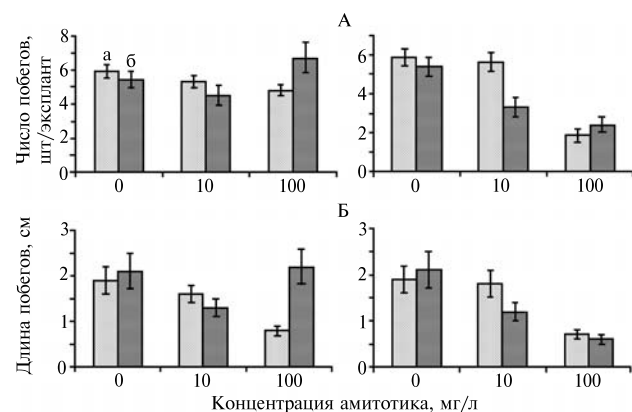


Рис. 2. Число (А) и длина (Б) побегов у эксплантов отдаленных гибридов плодовых семечковых культур, развившихся в условиях *in vitro* на среде, содержащей аценафтен (слева) и колхицин (справа): а — гибрид № 136, б — гибрид № 14/4.

цином были получены побеги как с нормальной морфологией, так и с различными нарушениями в развитии: увеличением листовых пластинок, измельчением листьев, образованием листьев с измененной формой листовых пластинок, светло-зеленого и салатового цвета, задержкой роста микропобегов, их утолщением и уплощением. Последняя аномалия наблюдалась у груше-яблоневого гибрида № 14/4. При изучении морфологии листьев обнаружены клетки эпидермиса с измененной формой, но схожими с контрольными размерами. Это в основном характерно для растений, подвергшихся воздействию аценафтена. Необходимо отметить, что после культивирования в течение 1-2 пассажей на средах размножения без амитотиков у большинства побегов восстановилась нормальная морфология. В то же время были отобраны растения, сохранившие измененные размеры и форму листьев. Листья и молодые корешки этих форм использовали для цитологического анализа.

2. Размер и число устьиц у отдаленных гибридов семечковых плодовых растений в зависимости от числа хромосом и содержания амитотика в среде культивирования

Форма	Амитотик, мг/л	Среднее число устьиц, шт/мм ²	Длина устьиц, мкм	Число хромосом в соматических тканях
№ 14/4 (контроль)		80,3±10,8	22,8±0,4	34
№ 14/4 К ₁ -25	Колхицин, 10	119,0±4,2	26,1±1,0	26, 34, 38, 51,
№ 14/4 К ₁ -2	Колхицин, 10	69,2±3,6	27,2±0,6	56, 68
№ 136 (контроль)		149,6±9,8	24,3±0,6	34
№ 136 К ₂ -27	Колхицин, 100	70,4±4,6	36,3±1,7	68
№ 136 А ₂ -22	Аценафтен, 100	80,4±9,5	31,8±2,1	68

При оценке числа и размеров устьиц на листовых пластинках у гибридов, развившихся в условиях *in vitro*, как косвенных показателей ploидности мы столкнулись с их сильным варьированием даже в пределах одного микрочеренка. Подобное характерно для многих культур, в том числе для исследованных гибридов. Однако варьирование этих признаков в искусст-

Сходные результаты получили при использовании колхицина на гибридной форме № 14/4, тогда как при ее культивировании на среде с аценафтенем (100 мг/л) отмечали стимулирующий эффект этого амитотика, что выражалось в повышении коэффициента размножения и большем приросте побегов в длину по сравнению с контролем (см. рис. 2).

При культивировании апексов на средах с аценафтенем и колхицином

венной культуре в разных листовых пластинках в случайной выборке листьев доходило до 5-кратного, что существенно влияло на полученные значения. Предварительный анализ плоидности (табл. 2) выявил наличие форм с разным размером замыкающих клеток и числом устьиц.

Подсчет числа хромосом в точках роста корешков подтвердил изменение плоидности гибридов у ряда изученных генетических линий. Многие формы, выведенные на средах с амитотиками, оказались миксоплоидами, в клетках которых примерно в 80 % случаев имелись анеуплоидные наборы хромосом. Например, у формы № 14/4 К₁-25 больше половины клеток (57,1 %) в соматических тканях содержали 26 хромосом. Кроме того, в меристемных тканях этой формы обнаружены клетки с 34, 38 и 51 хромосомой. Отобранные линии рябино-грушевого гибрида и гибридной формы № 14/4 после адаптации к нестерильным условиям высадили в открытый грунт опытного участка для дальнейшего изучения.

Таким образом, посредством полиплоидизации меристемных тканей *in vitro* получены полиплоидные формы отдаленных гибридов семечковых плодовых культур. До 32 % форм с измененной плоидностью выделены на средах с колхицином. Аценафтен в качестве полиплоидизирующего агента эффективен лишь при концентрации 0,01 % в питательной среде (выход форм с измененной плоидностью не превышал 7,1 %). Методы искусственной полиплоидизации перспективны для преодоления нескрещиваемости и восстановления плоидности отдаленных гибридов, а также отрицательного влияния различных факторов на всхожесть семян. После соответствующего цитологического контроля полученные формы могут быть успешно использованы при создании новых сортов с хозяйственно ценными признаками.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. К а с т р и ц к а я М.С. История культуры зародышей *in vitro*. В сб. науч. тр.: Плодоводство. Самохваловичи, 2002, т. 14: 161-166.
2. П о д д у б н а я - А р н о л ь д и В.А. Цитозембриология покрытосемянных растений. М., 1976.
3. Ж у ч е н к о А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). М., 2001, т. 1.
4. Б р е с л а в е ц Л.П. Полиплоидия в природе и опыте. М., 1963.
5. Б а в т у т о Г.А. Новые методы в селекции плодово-ягодных культур. Минск, 1977.
6. С е д ы ш е в а Г.А., С а н к и н Л.С., Д у т о в а Л.И., Ш е л а б о т и н Г.П. Селекция на полиплоидном уровне. В кн.: Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур /Под ред. Е.Н. Седова. Орел, 1995: 75-89.
7. M u r a s h i g e T., S k o o g F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15(13): 473-497.
8. Q u o i r i n M., L e r o i v g e P. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae*, 1977, 78: 437-442.
9. Ф р о л о в а Л.А., Л у ч н и к о в а С.В., Ч у в а ш и н а Н.П. Изучение соматических и мейотических хромосом плодовых и ягодных культур на ацетогематоксилиновых давленых препаратах. В сб.: 50 лет факультету биологии: итоги и перспективы. Мичуринск, 2002: 42-47.

ГНУ Всероссийский НИИ генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина,
393770 г. Мичуринск, Тамбовская обл., ЦГЛ,
e-mail: parom28@mail.ru, smuratova@yandex.ru

Поступила в редакцию
25 сентября 2008 года

METHODS OF TISSUES CULTURE AND POLYPLOIDY *in vitro* DURING BIGENERIC CROSSING OF PIP ORCHARD CROPS

R.V. Papikhin, S.A. Muratova

S u m m a r y

With the use of biotechnological methods the hybrid plants were obtained from seeds, which arised during bigeneric crossing of pip orchard crops. The results of investigations were presented regarding the induction of polyploidy in distant hybrids of pip orchard crops. The amitotic action of acenaphthene and colchicin on a development of plants was studied in the conditions *in vitro*. The analysis of morphological changes of sprouts and stomatal mechanism of plant leaves after the treatment by polyploidy chemicals was made. The determination of chromosomes number in root growing points of plants, obtained on nutrient media with 0.001 and 0.01 % acenaphthene and colchicin, confirms the chance of ploidy in hybrids.