

Л.В. Ташматова, кандидат сельскохозяйственных наук

О.В. Мацнева

Т.М. Хромова

В.В. Шахов

E-mail: tashmatova@vniispk.ru

УДК 634.11:581.143.5:631.526.32

DOI: 10.30850/vrsn/2020/4/22-25

РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ СОРТОВ ЯБЛОНИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Процесс клонального микроразмножения зависит от генотипических особенностей растений, состава питательных сред и гормонального фона на различных этапах культивирования. Цель исследований – изучение регенерационной способности эксплантов яблони перспективных сортов. Объектами служили колоновидные, иммунные и устойчивые к парше сорта яблони. Исследование проводили в лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВНИИСПК с применением общепринятых методик. Наибольшее количество жизнеспособных эксплантов было получено в фазе активного роста – в среднем от 72,1 до 88,5%. Отмечена максимальная контаминация у эксплантов, введенных в апреле независимо от стерилизующего препарата. Наибольшая инфицированность была у сортов: Орловское полесье (56,7%), Болотовское (51,4%), Поэзия (43,3%). У эксплантов, введенных в июне, заражение было незначительное. Так, у сортов Имрус и Поэзия инфекция проявилась в небольшой степени после применения 0,1%-го раствора мертиолята (1,2 и 2,4%), а у Гирлянды и Приокского был 100%-й выход чистых апексов. Среди иммунных сортов наибольший некроз отмечен у сорта Имрус (42,1%), а наименьший – у Кандиля орловского (5,1%), колоновидных – наибольший у Приокского (65,6%) и Восторга (65,6%). Большинство исследуемых сортов были больше инфицированы некрозом после использования 0,1% раствора мертиолята. Исследования проводили на фоне сред QL и Фардзиновой, рекомендованной для груши. Концентрация БАП 1,0 и 2,0 мг/л. Среди иммунных сортов содержание БАП 2,0 мг/л в среде QL вызывала наибольшую пролиферативную активность у сортов: Кандиль орловский (3,4), Болотовское (4,5) и Орловское полесье (2,9). У сортов Имрус и Ветеран наибольший коэффициент размножения получен на среде Фардзиновой, содержащей БАП в обеих концентрациях. Для всех сортов концентрация БАП способствующая образованию побегов более 1 см – 1,0 мг/л.

Ключевые слова: яблоня, сорта, срок введения, стерилизующий агент, питательная среда.

L.V. Tashmatova, PhD in Agricultural sciences

O.V. Matsneva

T.M. Khromova

V.V. Shakhov

E-mail: tashmatova@vniispk.ru

REGENERATION OF APPLE VARIETIES *IN VITRO* CULTURE

The process of clonal micropropagation is influenced by the genotypic characteristics of plants, the composition of nutrient media and the hormonal background at various stages of cultivation. The purpose of the research was to study the regenerative capacity of apple explants of promising varieties. The objects were colon-shaped, immune and scab-resistant apple varieties. The study was carried out in the laboratory of biotechnology of VNIISPК using generally accepted methods. The largest number of viable explants was obtained during the active growth phase, averaging from 72.1 to 88.5%. Maximum contamination was observed in explants introduced in April, regardless of the sterilizing agents. The highest infection rate was in the varieties Orlovskoe polesie (up to 56.7%), Bolotovskoe (up to 51.4%), Poeziya (up to 43.3%). In the explants introduced in June, the infection was insignificant. Thus, the Imrus and Poeziya varieties showed a small degree of infection after using 0.1% mertiolate solution (1.2% and 2.4%), and the garland and Priokskoe varieties had a 100% yield of pure apexes. Among immune varieties, the highest necrosis was evident in the variety of Imrus (42.1%) and the smallest in the variety Kandil orlovsky (5.1%) have the largest column-the variety Priokskoe (65.6 per cent) and Vostorg (65.6%). In most of the studied varieties, the greatest necrosis was observed after using 0.1% mertiolate solution. The study was carried out on the background medium QL and Fardzinova recommended for pears. Concentration of BAP 1.0 and 2.0 mg/l. Among the immune varieties, the content of BAP 2.0 mg/l in the QL medium caused the greatest proliferative activity in the varieties Kandil orlovsky (3.4), Bolotovskoe (4.5) and Orlovskoe polesie (2.9). Varieties of Imrus and a Veteran of the highest rate of multiplication were obtained in Fardzinova on medium containing BAP in both concentrations. In all varieties, the concentration of BAP 1. mg/l contributed to the formation of shoots more than 1 cm, i.e. suitable for rooting.

Key words: Apple tree, varieties, introduction period, sterilizing agent, nutrient medium.

В связи с интенсификацией садоводства и постоянно изменяющимся сортиментом семечковых культур все большее значение приобретает изучение регенерационной способности различных сортов яблони *in vitro* и оптимизация элементов технологии клонального микроразмножения. Известно, что на этот процесс оказывает влияние ряд факторов. Ведущую роль играют генотипические особенности растений, состав питательных сред и гормональный фон на различных этапах культивирования. [4, 5] Все они устанавливаются экспериментальным путем.

В культуре *in vitro* наиболее исследованы клоновые подвои яблони [1, 2], а сорта только начинают изучать. Для размножения яблони в культуре *in vitro* часто рекомендуют модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга (MS), обогащенную витаминами или Кворина-Лепуавра (QL).

Цель работы – изучить регенерационную способность эксплантов яблони перспективных сортов, также генотипическую реакцию сортов яблони на условия культивирования: состав питательной среды, концентрацию 6-бензиламинопурина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований – иммунные к парше сорта: *Болотовское*, *Кандиль орловский*, *Имрус*, *Орловское полесье*, устойчивый к парше сорт *Ветеран* и колониовидные сорта *Гирлянда*, *Приокское*, *Поэзия* и *Восторг*.

Исходным материалом служили: в период выхода из состояния покоя (апрель) – щитки с одревесневших побегов, во время активного роста (июнь) – верхушки растущих побегов. Исследования проводили по методике О.В. Матушкиной и И.Н. Прониной [4], учитывали результаты работы белорусских исследователей. [3] Для стерилизации эксплантов использовали 0,1 %-е растворы мертиолята и сулемы.

Культивировали на питательных средах Кворина-Лепуавра и Фардзиновой (рекомендованной для груши). [6] Концентрации БАП – 0,5, 0,8, 1,0 и 2,0 мг/л.

Обрабатывали экспериментальные данные по рекомендациям В.А. Попова, В.И. Кашина, А.Г. Курсакова. [7]

РЕЗУЛЬТАТЫ

На этапе инициации исследована возможность получения первичной культуры сортов яблони в условиях *in vitro*. Основная задача – установить зависимость приживаемости эксплантов яблони от генотипа, сроков инициации и стерилизующих агентов. Основные проблемы: зараженность эксплантов грибной и бактериальной инфекцией, приживаемость эксплантов и фенольное окисление апексов и питательной среды.

Введение в культуру яблони проводили в два периода – выхода из покоя (апрель) и активного роста (первая половина июня). Выявлено, что на уровень инфицированности и некроза у всех исследуемых сортов и на выход жизнеспособных эксплантов у иммунных сортов в большей степени оказал влияние срок введения (фактор В), чем сортовые особенности (фактор А) и взаимодействие факторов (табл. 1, 2).

Значимые различия между сортами наблюдаются во время введения апексов яблони в фазе выхода из покоя (апрель) по трем показателям инициации – контаминация, некроз и выход жизнеспособных эксплантов. Наибольшее количество жизнеспособных эксплантов получено в фазе активного роста – в среднем от 72,1 до 88,5 %.

При изучении реакции сортов на стерилизующий агент максимальная контаминация отмечена у эксплантов, введенных в апреле не зависимо от стерилизующего препарата. Наибольшей инфицированностью отличались иммунные сорта: *Орловское полесье*, *Болотовское*. У колониовидных сортов контаминация проявилась в большей степени у сорта *Поэзия*, экспланты, введенные в июне, были заражены незначительно. У сортов *Имрус* и *Поэзия* инфекция проявилась в небольшой степени после применения 0,1 %-го раствора мертиолята, а *Гирлянда* и *Приокское* характеризовались 100 %-м выходом чистых апексов (табл. 3).

Отмечен также некроз тканей, который приводил к гибели эксплантов, что возможно вследствие

Таблица 1. Показатели инициации сортов яблони в различные сроки введения

Сорт	Контаминация, %		Некроз, %	
	Апрель	Июнь	Апрель	Июнь
<i>Кандиль орловский</i>	49,1	7,6	0	10,9
<i>Имрус</i>	26,0	1,7	22,8	20,7
<i>Болотовское</i>	50,1	2,9	12,7	14,4
<i>Орловское полесье</i>	53,0	0,7	10,6	12,0
<i>Гирлянда</i>	18,2	0	43,8	18,8
<i>Приокское</i>	20,1	0	51,5	27,9
<i>Поэзия</i>	40,0	0,5	42,0	11,0
<i>Восторг</i>	16,6	0,7	52,0	17,9
НСР _{0,5} по фактору В		$F_{\text{факт}} > F_{\text{теор}}$	$F_{\text{факт}} > F_{\text{теор}}$	

Таблица 2. Выход жизнеспособных эксплантов сортов яблони в различные сроки введения

Сорт	Выход эксплантов, %	
	Апрель	Июнь
Иммунные сорта		
<i>Кандиль орловский</i>	50,9	81,5
<i>Имрус</i>	51,2	77,6
<i>Болотовское</i>	37,2	82,7
<i>Орловское полесье</i>	36,4	87,3
НСР _{0,5} по фактору В		$F_{\text{факт}} > F_{\text{теор}}$
Колониовидные сорта		
<i>Гирлянда</i>	38,0	81,2
<i>Приокское</i>	28,4	72,1
<i>Поэзия</i>	18,0	88,5
<i>Восторг</i>	31,4	81,4
НСР _{0,5}		$F_{\text{факт}} < F_{\text{теор}}$

Таблица 3. Инфицированность эксплантов после применения различных стерилизаторов, %

Сорт	Апрель		Июнь	
	Сулема	Мертиолят	Сулема	Мертиолят
<i>Кандиль орловский</i>	42,7	44,1	1,9	2,1
<i>Орловское полесье</i>	56,7	55,3	1,1	1,1
<i>Болотовское</i>	51,4	50,0	5,1	2,1
<i>Имрус</i>	13,4	19,6	0	1,2
<i>Гирлянда</i>	12,5	19,0	0	0
<i>Приокское</i>	23,7	26,0	0	0
<i>Поэзия</i>	43,3	43,0	0	2,4
<i>Восторг</i>	12,8	22,0	1,2	2,4
Итого	32,1	35,0	1,2	1,4

действия стерилизующих веществ и окисления фенолов. Среди иммунных сортов наибольший некроз проявился у сорта *Имрус*, а наименьший у сорта *Кандиль орловский*, среди колониовидных наибольший некроз отмечен у сортов *Приокское* и *Восторг*.

У большинства исследуемых сортов был отмечен некроз после использования 0,1 %-го раствора мертиолята (табл. 4).

В среднем при использовании обоих стерилизаторов по срокам введения проявление некроза тканей было практически одинаковым. Видимо вели-

ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ

чина этого показателя в большей степени зависела от состояния апекса и от ростовых процессов, протекающих в различные фазы роста.

Уровень приживаемости зависит от первых двух показателей. Чем они выше, тем ниже выход жизнеспособных эксплантов. На приживаемость апексов большее влияние оказали сроки инициации, чем стерилизующие агенты. Меристемы, введенные в первой половине июня, оказались наиболее жизнеспособными (табл. 5).

Через три недели начинали развиваться примордиальные листья. Меристемы, введенные в апреле, сохраняя жизнеспособность на первом этапе, при последующем культивировании отмирали. Мы наблюдали полную гибель апексов у сортов *Кандиль орловский*, *Болотовское* и *Восторг*.

В весенний и летний сроки введения в культуру *in vitro* отмечено 100 %-е выделение в питательную среду продуктов окисления фенолов. Эти вещества вызывают гибель таких мелких структур, как меристема, а также оказывают ингибирующее воздействие на рост побегов и образование дополнительных почек при культивировании. Установлено, что эффективный способ снятия этого воздействия – выдерживание исходного материала во время взятия меристем в 0,3 %-м растворе аскорбиновой кислоты и введение этого препарата в больших концентрациях в состав питательной среды.

Экспланты культивировали на питательной среде Кворина-Лепуавра на фоне БАП 0,5 мг/л в течение трех недель. За это время развивалась розетка листьев и появлялся побег. Установлено, что для успешного перехода развития эксплантов яблони от первого этапа ко второму необходимо постепенное повышение концентрации цитокинина. Поэтому следующие три недели их культивировали на той же среде, но повысив концентрацию БАП до 0,8 мг/л. Наблюдали рост листьев и побега, у единичных эксплантов образовывались одна-две дополнительных почки.

Основная цель второго этапа – обеспечение быстрого размножения эксплантов в течение длительного культивирования, что достигается снятием апикального доминирования при введении в питательную среду оптимальной концентрации цитокининов и правильным подбором питательных сред. Исследования проводили на фоне сред Кворина-Лепуавра и Фардзиновой, рекомендованной для груши. Концентрация БАП – 1,0 и 2,0 мг/л. Среди иммунных сортов содержание БАП 2,0 мг/л в среде QL вызывала наибольшую пролиферативную активность у сортов *Кандиль орловский*, *Болотовское* и *Орловское полесье*, а у сортов *Имрус* и *Ветеран* наибольший коэффициент размножения получен на среде Фардзиновой, содержащей БАП в обеих концентрациях (табл. 6).

Выявлено влияние на коэффициент размножения генотипа (фактор А) и состава питательной среды (фактор В), а также их взаимодействия.

У колониальных сортов наибольший коэффициент размножения обеспечивала концентрация БАП 2,0 мг/л (табл. 7).

Установлено, что коэффициент размножения у колониальных сортов зависел от состава питатель-

ной среды (фактор В), а влияние сортовых особенностей не выявлено. У всех сортов концентрация БАП 1,0 мг/л способствовала образованию побегов более 1 см – пригодных к укоренению.

Таблица 4.

Некроз эксплантов после применения различных стерилизаторов, %

Сорт	Апрель		Июнь	
	Сулема	Мертилят	Сулема	Мертилят
<i>Кандиль орловский</i>	5,1	7,8	15,5	7,8
<i>Орловское полесье</i>	6,7	28,3	4,9	11,0
<i>Болотовское</i>	6,0	10,4	11,2	29,4
<i>Имрус</i>	35,9	42,1	25,6	25,0
<i>Гирлянда</i>	45,5	41,9	25,0	12,5
<i>Приокское</i>	42,4	51,0	24,9	30,9
<i>Поэзия</i>	37,7	40,0	15,7	5,1
<i>Восторг</i>	65,6	51,8	26,8	6,6
Итого	36,0	34,0	18,7	16,0

Таблица 5.

Выход эксплантов после применения различных стерилизаторов, %

Сорт	Апрель		Июнь	
	Сулема	Мертилят	Сулема	Мертилят
<i>Кандиль орловский</i>	52,2	48,1	82,6	90,1
<i>Орловское полесье</i>	36,0	27,0	94,0	87,8
<i>Болотовское</i>	42,6	39,6	83,7	68,5
<i>Имрус</i>	50,7	38,3	74,4	75,0
<i>Гирлянда</i>	42,0	39,1	75,0	87,5
<i>Приокское</i>	33,9	23,0	75,1	69,1
<i>Поэзия</i>	19,0	17,0	84,3	92,5
<i>Восторг</i>	21,6	26,2	72,0	91,0
Итого	37,2	32,3	80,1	82,7

Таблица 6.

Коэффициент размножения эксплантов яблони иммунных и устойчивых к парше сортов на этапе микро размножения

Сорт	QL, БАП 1,0мг/л	QL, БАП 2,0мг/л	Фардзиновой, БАП 1,0 мг/л	Фардзиновой, БАП 2,0 мг/л
	<i>Кандиль орловский</i>	2,9±0,4	3,4±0,3	1,8±0,1
<i>Имрус</i>	2,3±0,2	2,1±0,2	3,3±0,3	2,3±0,3
<i>Орловское полесье</i>	2,3±0,2	2,9±0,2	1,4±0,1	-
<i>Болотовское</i>	3,0±0,3	4,5±0,9	2,7±0,2	3,3±0,3
<i>Ветеран</i>	1,9±0,1	1,3±0,1	2,4±0,2	2,4±0,3
НСР _{0,5}			$F_{\text{факт} < F_{\text{теор}}}$	

Таблица 7.

Коэффициент размножения эксплантов яблони колониальных сортов на этапе микро размножения

Сорт	6-БАП 1,0мг/л				Среднее значение
	I пассаж	II пассаж	III пассаж	IV пассаж	
<i>Гирлянда</i>	2,3±0,3	1,3±0,1	3,2±1,2	2,5±0,3	2,3±0,5
<i>Приокское</i>	1,1±0,1	2,9±0,1	3,1±0,2	5,2±0,6	3,1±0,2
<i>Поэзия</i>	1,0±0,1	1,9±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1
	6-БАП 2,0мг/л				
<i>Гирлянда</i>	5,3±0,4	4,0±0,3	3,2±0,3	4,0±0,3	4,1±0,3
<i>Приокское</i>	6,2±0,9	3,8±0,9	4,1±0,4	2,7±0,3	4,2±0,6
<i>Поэзия</i>	3,1±0,6	3,3±0,4	4,2±0,6	3,7±0,4	3,6±0,5
НСР _{0,5} по фактору В			$F_{\text{факт} > F_{\text{теор}}}$		

Ризогенез – следующий важный этап клонального микроразмножения. Установлена низкая укореняемость микропобегов яблони в питательной среде. Так, у сорта *Болотовское* этот показатель составил 10 % всех высаженных микропобегов на питательную среду QL с добавлением ИМК 2,0 мг/л и ГК 0,5 мг/л. Корни были слабо развиты и при адаптации микрорастения часто погибали. Поэтому мы использовали микропрививку. Данный прием позволяет совмещать и укоренение, и адаптацию. Приживаемость таких растений может достигать 90 %.

Таким образом, на регенерационную способность оказывают как генотипические особенности яблони, так и условия культивирования – особенности введения, состав питательной среды и содержание фитогормонов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Беседина, Е.Н. Усовершенствование технологии клонального микроразмножения подвоев яблони на этапе введения в культуру *in vitro* / Е.Н. Беседина, Л.Л. Бунцевич // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 111. – С. 1716–1734.
2. Бунцевич, Л.Л. Оптимизация питательных сред при клональном микроразмножении подвоев яблони серии СК / Л.Л. Бунцевич, А.Т. Киян, Е.Н. Беседина, М.А. Костюк // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – Т. 37. – № 1. – С. 46–51.
3. Кухарчик, Н.В. Размножение плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro* / Н.В. Кухарчик, М.С. Кастрицкая, С.Э. Семенов и др.; под общ. ред. Н.В. Кухарчик. – Минск: Беларуская навука. – 2016. – 208 с.
4. Матушкина, О. В. Технология клонального микроразмножения яблони и груши / О.В. Матушкина, И.Н. Пронина // Методические рекомендации – Мичурино – наукоград РФ. – 2008. – 32 с.
5. Матушкина О.В. Регенерационная способность перспективных сортов яблони *in vitro* / О.В. Матушкина,

И.Н. Пронина // Плодоводство и ягодоводство России. – 016. – Т. 47 (ч. 2). – С. 211–216.

6. Питательная среда для микроразмножения груши/ И.М. Фардзинова: пат. 2141524 РФ: А01Н4/00 от 20.11.1999.
7. Потапов, В.А. Методы обработки экспериментальных данных в плодоводстве / В.А. Потапов, В.И. Кашин, А.Г. Курсакоа. – М.: «Колос». – 1997. – 144 с.

LIST OF SOURCES

1. Besedina, E.N. Usovershenstvovanie tekhnologii klonal'nogo mikrorazmnozheniya podvoev yabloni na etape vvedeniya v kul'turu *in vitro* / E.N. Besedina, L.L. Buncevic // Politematicheskij setevoy elektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2015. – № 111. – S. 1716–1734.
2. Buncevic, L.L. Optimizaciya pitatel'nyhsred pri klonal'nom mikrorazmnozhenii podvoev yabloni serii SK / L.L. Buncevic, A.T. Kijan, E.N. Besedina, M.A. Kostyuk // Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii. – 2013. – T. 37. – № 1. – S. 46–51.
3. Kuharchik, N.V. Razmnozhenie plodovyh i yagodnyh rastenij v kul'ture *in vitro* / N.V. Kuharchik, M.S. Kastrickaya, S.E. Semenas i dr.; pod obshch. red. N.V. Kuharchik. – Minsk: Belaruskaya navuka. – 2016. – 208 s.
4. Matushkina, O.V. Tekhnologiya klonal'nogo mikrorazmnozheniya yabloni i grushi / O.V. Matushkina, I.N. Pronina // Metodicheskie rekomendacii – Michurinsk – naukograd RF. – 2008. – 32 s.
5. Matushkina, O.V. Regeneracionnaya sposobnost' perspektivnyh sortov yabloni *in vitro* / O.V. Matushkina, I.N. Pronina // Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii. – 016. – T. 47 (ch. 2). – S. 211–216.
6. Pitatel'naya sreda dlya mikroklonal'nogo razmnozheniya grushi/ I.M. Fardzinova: pat. 2141524 RF: A01H4/00 ot 20.11.1999.
7. Potapov, V.A. Metody obrabotki eksperimentan'nyh dannyh v plodovodstve / V.A. Potapov, V.I. Kashin, A.G. Kursakoa. – M.: «Kolos». – 1997. – 144 s.