

УДК 634.11:631.531:581.16

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ ЯБЛОНИ *IN VITRO***Матушкина О.В.**, канд. с.-х. наук, **Пронина И.Н.**, канд. с.-х. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт садоводства им. И.В. Мичурина»
(Мичуринск)

Реферат. Установлено, что оптимальной средой для большинства сортов яблони на этапах введения в культуру *in vitro* и собственно микроразмножения является среда Кворина-Лепуавра. Для стимулирования ризогенной активности сортов яблони, которые относятся к трудноукореняемым генотипам, целесообразно использовать замачивание микропобегов в водном растворе ИМК. Этот прием позволяет довести их укореняемость до 73,3-93,3 %.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, яблоня, сорт, питательная среда, цитокинин, ауксин

Summary. It is established that the optimal medium for the most researched apple-tree's varieties, on the stages of introduction in culture and actually micropropagation, is the medium of Quorin-Lepoivre. For stimulating of rhizogenic activity of apple varieties which are difficult create the roots, it is advisable to soak micro shoots in the water solution of IBA. This method makes possible to increase in rooting capacity of apple varieties up to 73,3-93,3 %.

Key words: clonal micropropagation, apple-tree, variety, nutrient medium, cytokinin, auxin

Введение. Первоочередной задачей садоводства на современном этапе является создание долголетних, ежегодно плодоносящих, удобных в эксплуатации, быстро окупающихся и стабильно приносящих прибыль, адаптированных к местным природно-климатическим и рыночным условиям насаждений плодовых культур. Важное значение в решении этих проблем отводится производству высококачественного, конкурентоспособного посадочного материала, оздоровленного от вирусных, фитоплазменных и грибных заболеваний. Закладка таким материалом промышленных насаждений яблони позволяет в зависимости от сортовых особенностей и вида вирусной инфекции повысить урожайность на 17-55 % и улучшить качество плодов [1]. Увеличение выпуска высококачественного оздоровленного посадочного материала может быть осуществлено только за счет использования современных технологий размножения и оздоровления. В настоящее время в ряде стран Европы и Америки уже невозможно представить систему производства сертифицированного посадочного материала без широкого использования метода культуры изолированных тканей.

Сдерживающим фактором промышленного размножения яблони с использованием метода клонального микроразмножения является ярко выраженный индивидуальный характер при культивировании *in vitro*. Размножение сортов яблони с использованием изолированных меристем изучено мало или вообще не изучено. К тому же у сортов регенерационная способность *in vitro* значительно ниже, чем у подвоев [2-6].

Цель исследований: изучить особенности регенерации перспективных сортов яблони *in vitro*.

Объекты и методы исследований. Объекты наших исследований: сорта яблони – Лобо, Жигулевское, Мартовское, Лигол.

Для введения в культуру *in vitro* в качестве исходного материала использовали растущие верхушки длиной 3-5 см. Стерилизацию эксплантов проводили раствором «Белизна», разбавленным в 3 раза в течение 5 минут.

Культивирование эксплантов проводили на средах Кворина-Лепуавра (QL) и Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрации 0,3-1,0 мг/л, а также тидиазурина (TDZ) 0,2 мг/л, 2-изопентиламинопурина (2-ip) 3,0 мг/л и БАП 1,0 мг/л в сочетании с аденин-сульфатом (АС) 50,0 мг/л. Для индукции ризогенеза использовали индолил-3-масляную кислоту (ИМК) в концентрации 3,0 мг/л в течение 7-10 дней.

Условия культивирования: освещенность 2-3 тыс. люксов, температура воздуха $+24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, длительность фотопериода 16 часов, относительная влажность воздуха 30-40%.

Этап пролиферации оценивали по количеству эксплантов, пригодных к клонированию и подсчитывали коэффициент размножения путем деления количества микропобегов на количество эксплантов. Оценка процесса ризогенеза проводилась в динамике путем подсчета количества микропобегов с корнями. В конце опыта (при переносе в нестерильные условия) анализировали количество основных корней и их длину.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась методом дисперсионного анализа [7]. Существенность различий по количеству и длине корней оценивалась по наименьшей существенной разности (НСР_{05}), а по укореняемости – с помощью t-критерия Дункана. При этом наличие одинаковых букв при цифровых показателях указывает на отсутствие различий при $P=0,05$.

Обсуждение результатов. Регенерационная способность в культуре изолированных тканей, в значительной степени, зависит как от генотипических особенностей растений, так и от химических, физических и физиологических факторов, которые в той или иной мере проявляются на основных этапах клонального микроразмножения растений.

К химическим факторам культивирования относят минеральный и гормональный состав питательной среды. При размножении большинства садовых культур наиболее часто используют среды Мурасиге-Скуга и Кворина-Лепуавра. Культивирование эксплантов яблони сортов Лобо, Жигулевское, Мартовское, Лигол на этапе введения в культуру *in vitro* на средах Мурасиге-Скуга и Кворина-Лепуавра показало, что для большинства генотипов, за исключением сорта Мартовское, лучшей средой для инициации меристематических тканей являлась среда Кворина-Лепуавра (рис. 1).

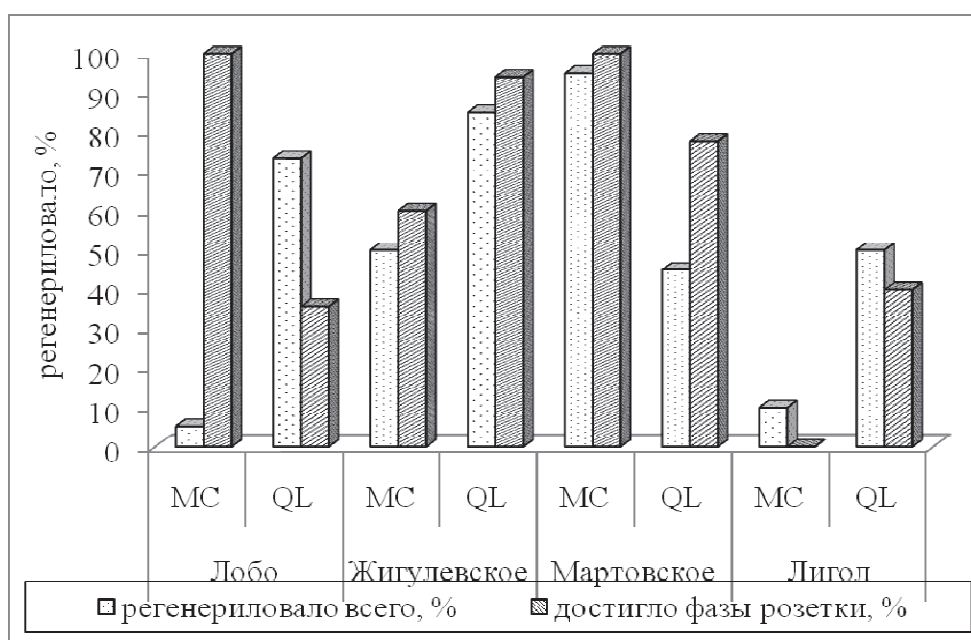


Рис. 1. Влияние минерального состава питательной среды на инициацию меристематических тканей сортов яблони

Очень важную роль в успехе размножения играет генотип исходного растения, так как от него в большей степени зависит морфогенетический потенциал культивируемых тканей и органов [8]. Сравнительное изучение темпов дифференциации меристематических тканей сортов и подвоев яблони выявило, что у подвоев она значительно выше, чем у сортов [9]. Среди изучаемых сортов, только на сорте Жигулевское после двукратного субкультивирования у 7,6 % эксплантов наблюдалось образование дополнительных пазушных почек (табл. 1).

Таблица 1 – Регенерационная способность сортов яблони

Сорт	Получено клонов в пассажах, %			Коэффициент размножения в 4 пассаже, шт./экспл.
	2	3	4	
Лобо	0,0	0,0	0,0	1,0
Жигулевское	7,6	7,6	85,7	2,7
Мартовское	0,0	12,5	12,5	2,0
Лигол	0,0	53,3	100,0	4,7
НСР ₀₅				0,3

При дальнейшем культивировании (4 пассаж) вышеуказанных сортов установлено, что самой высокой регенерационной способностью отличался сорт Лигол. Количество образованных клонов у данного сорта превосходило соответствующий показатель у сортов Мартовское и Жигулевское на 14,3 и 87,5 %, соответственно. У сорта яблони Лобо даже после 4-х кратного субкультивирования не наблюдалось формирования пазушных почек. Сорт Лигол выделялся высокой регенерационной способностью не только по количеству образованных клонов, но и по коэффициенту размножения, который превосходил остальные сорта в 2,3-4,7 раза.

На этапе собственно микроразмножения сортов плодовых культур, особенно яблони, сложно добиться эффективной пролиферации и массовой закладки пазушных почек. Кроме того, зачастую образуются микропобеги длиной менее 1,5 см, которые непригодны для укоренения и требуется дополнительное субкультивирование для их элонгации, что осложняет разработку промышленной технологии размножения сортов яблони *in vitro*.

При культивировании сортов Лобо и Жигулевское на средах с биологически активными веществами из группы цитокинонов (БАП, 2-*ip*, ТДЗ и БАП в сочетании с АС) не удалось существенно улучшить качество и увеличить количество микропобегов пригодных для укоренения, за исключением варианта с БАП в сочетании с аденин-сульфатом у сорта Лобо (рис. 2). При этом наблюдалось не только увеличение на 15,3 % количества микропобегов с оптимальной для укоренения длиной, но и коэффициента размножения в 1,3 раза по сравнению с контролем.

Введение в состав среды более сильного, чем биологически активного препарата (БАП) и 2-*ip*, цитокинина ТДЗ оказалось не эффективным, как при культивировании сорта яблони Лобо, так и сорта Жигулевское.

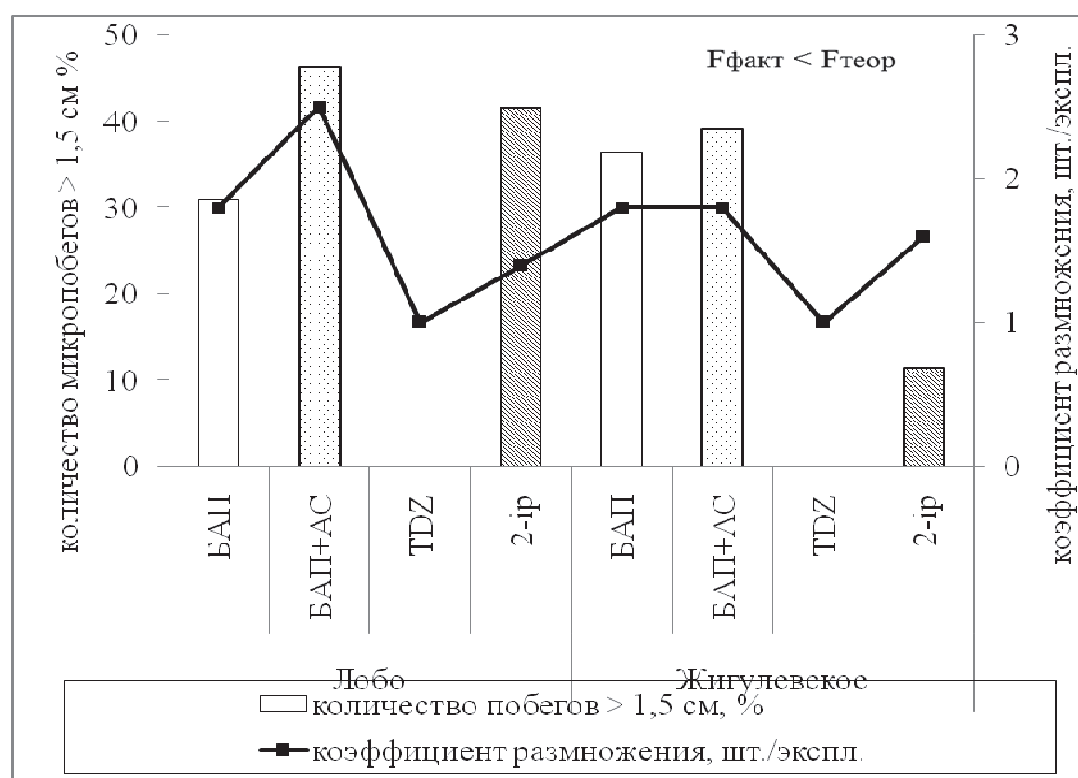


Рис. 2. Влияние биологически активных веществ на регенерационную способность сортов яблони

Наиболее оптимальным приемом для укоренения большинства генотипов древесных садовых растений *in vitro* является замачивание микрочеренков в водном растворе ИМК с последующей посадкой на безгормональную среду. Сорта яблони относятся к трудноукореняемым генотипам, поэтому нами проводились исследования по стимулированию их ризогенной активности с использованием данного способа воздействия ауксином.

Исследования показали, что увеличение длительности замачивания в ИМК до 7 и 10 дней способствовало повышению укореняемости сорта Лобо до 73,3 и 93,3 %, соответственно (табл. 2). Для сорта Жигулевское длительность экспозиции должна быть не менее 10 дней.

Таблица 2 – Ризогенез сортов яблони в зависимости от длительности воздействия ИМК

Сорт	Длительность воздействия, дней	Укореняемость через ... недель, %			Количество корней, шт./раст.	Средняя длина корней, см
		2	3	4		
Лобо	7	6,7	66,7	73,3 b	3,7	3,2
	10	0,0	73,3	93,3 a	2,2	2,7
НСР ₀₅					F _{факт} < F _{теор}	
Жигулевское	7	0,0	6,7	13,3 b	1,5	1,2
	10	0,0	20,0	33,3 a	1,0	2,5
НСР ₀₅					F _{факт} < F _{теор}	0,9

По качественным показателям развития корневой системы существенных различий у исследуемых сортов не наблюдалось, за исключением того, что увеличение длительности обработки ИМК у сорта Жигулевское повышало длину корней в 2,1 раза.

Выводы. Результаты наших исследований выявили большую зависимость регенерационной способности сортов яблони на всех этапах размножения *in vitro* от генотипических особенностей растений.

Установлено, что:

- оптимальной средой для размножения большинства изучаемых сортов является среда Кворина-Лепуавра.
- культивирование сорта Лобо на среде с БАП в сочетании с аденин-сульфатом увеличивает на 15,3 % не только количество микропобегов длиной более 1,5 см, но и коэффициент размножения в 1,3 раза по сравнению с контролем.
- для стимулирования процессов корнеобразования у сортов яблони следует увеличивать длительность обработки ИМК до 7-10 дней с учетом генотипа.

Литература

1. Минаев, В.А. Биологические особенности слаборослых клоновых подвоев яблони при клональном микроразмножении: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – Мичуринск: МичГАУ, 2005. – 23 с.
2. Высоцкий, В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. – М.: ВСТИСП, 1998. – 44 с.
3. De Klerk, G.J. Factors affecting adventitious root formation in microcultings of Malus / G.J. De Klerk, J. TerBrucce // COST congr. Micropropagot and Endomycorrhizat, Dijon, 21-23 May, 1992. - Agronomie. - 1992. - Vol. 12, № 10. - P. 747-755.
4. Lane, W.D. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin / W.D. Lane, J.M. McDaugald // Con. J. Plant Sci. - 1982. - Vol. 62, №3. - P. 689-694.
5. Nemeth, G. Induction of rooting / G. Nemeth // Biotechnology in Agriculture and Forestry.-Sprigen-Verlag-Berlin-Heidelberg, 1986. – Vol. 1, № 1.– Chapter IV.– P. 49-64.
6. Sriskandrajah, S. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation in vitro / S. Sriskandrajah, M.G. Mullins // J. Horticultural Science. – 1981. – Vol. 56, № 1. – P. 71-76.
7. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б.А. Доспехов. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1985. – 416 с.
8. Катаева, Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
9. Матушкина, О.В. Особенности размножения садовых культур *invitro* / О.В. Матушкина, И.Н. Пронина // Инновационные основы развития садоводства России: Труды ВНИИС им. И.В. Мичурина. – Воронеж: Кварта, 2011. – С. 181-188.