

УДК 577.114 : 581.143.6

**СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ ОТДАЛЁННЫХ ГИБРИДОВ *MALUS*
SIEBOLDII В КУЛЬТУРУ *IN VITRO***

Папихин Роман Валерьевич

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

parom10@mail.ru

Муратова Светлана Александровна

кандидат биологических наук, доцент

smuratova@yandex.ru

Дубровский Максим Леонидович

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

element68@mail.ru

Григорьева Елена Викторовна

аспирант

grigorieva-elena1615@yandex.ru

Мичуринский государственный аграрный университет

г. Мичуринск, Россия

Аннотация. Предложен протокол введения в культуру *in vitro* гибридных семян *Malus sieboldii*, полученных в разных комбинациях скрещивания. Установлено, что дополнительная предобработка препаратами Экоцид С(1,0%) и «БиоПаг» (0,4%) в течении 50 минут способствует получению стерильных эксплантов до 61,5% по сравнению с контролем. Применение диссекции семядолей позволяет получить до 65,3% гибридных растений по сравнению с 4,2% с контролем.

Ключевые слова: *Malus sieboldii*, отдалённая гибридизация, культура *in vitro*, стерилизующий препарат.

История развития селекции показывает, что одним из наиболее ценных путей развития родового потенциала хозяйственно-ценных признаков растений является отдалённая гибридизация. Для многих исследователей всегда представлялось заманчивым создание новых форм культурных растений, в которых были бы объединены с хозяйственной точки зрения признаки разных видов и родов [1-10, 12].

На основании многолетних селекционных работ по получению слабо-рослых клоновых подвоев яблони в ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ чётко обозначалась проблема получения гибридного потомства *Malus sieboldii* Rehd. Традиционным способом – высевом семян. Смена схем стратификации и условий культивирования на этапе прорастания семян не дали положительного результата.

Исследование цитогенетических особенностей *Malus sieboldii* Rehd из генетической коллекции ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ показало, что данная видовая форма является миксоплоидом и содержит в ядрах 34 и 51 хромосому ($2n=2x$, $3x=34, 51$) [10]. Данный факт указывает на возможную причину низкой всхожести семян.

В связи с этим, целью исследований является оптимизация методов культуры зародышей для получения межвидовых гибридов *Malus sieboldii* Rehd.

Объекты и методы исследования

Биологическими объектами исследований служили гибридные семена, полученные в результате скрещивания (комбинация 1 – *Malus sieboldii* x Малыш Будаговского; 2 – *M. sieboldii* x 60-160; 3 – *M. sieboldii* x 76-3-6).

Семена выделяли из созревших плодов, предварительно выдержанных 2-3 месяца при температуре +4 °С.

Для стерилизации эксплантов использовали следующие схемы:

1. промышленный дезинфектант «Белизна» ($\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - натрий хлорноватистокислый) / дистиллированная вода (1:1). Экспозиция 5 минут.

Трёхкратная промывка автоклавированной дистиллированной водой 3(контроль);

2. Препарат Экоцид С (1,0%), экспозиция 50 минут. Промышленный дезинфектант «Белизна» / дистиллированная вода (1:1). Экспозиция 5 минут. Трёхкратная промывка автоклавированной дистиллированной водой 3;

3. Препарат БиоПаг С (0,4%), экспозиция 50 минут. Промышленный дезинфектант «Белизна» / дистиллированная вода (1:1). Экспозиция 5 минут. Трёхкратная промывка автоклавированной дистиллированной водой.

Для культивирования семян на этапе введения использовали минеральную основу питательной среды MS [11] 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.

После посадки на питательную среду семена переносили в условия культуральной комнаты с температурой 24 ± 2 °С, освещенностью 2000-2500 люкс и фотопериоде 16 ч день/8 ч ночь.

Через 4 недели культивирования, после набухания семян скальпелем отрезали примерно 1/3 семени со стороны семядолей.

Результаты исследований

После введения гибридных семян *M. sieboldii* в стерильные условия наличие грибной инфекции зафиксировали на 5 сутки после посадки. Бактериальная инфекция проявилась на 10 сутки и в течении последующих 20 суток выявляли отдельные экспланты с признаками заражения.

В течении 4 недель из 130 гибридных семян (в трёх комбинациях) проросло только 2 шт. в комбинации *Malus sieboldii* x Малыш Будаговского. После указанного продолжительного этапа культивирования проявились все возможные варианты экзогенной инфекции.

В результате применения разных способов стерилизации установили, что дополнительная обработка препаратами Экоцид С и «БиоПаг» способст-

вует получению стерильных эксплантов от 7,1% до 61,5% по сравнению с контролем. Наилучший вариант применения данных препаратов зафиксировали в комбинации *Malus sieboldii* x 76-3-6.

Поскольку материнским растением во всех комбинациях скрещивания был один и тот же генотип, то морфологические и биохимические особенности плодов были также одинаковыми для развития и накопления экзо- и эндогенной инфекции. В результате оценки стерилизации эксплантов во всех комбинациях скрещивания удалось подтвердить эффективность предложенных схем. Наилучшие результаты получены при использовании препарата Экоцид С (1,0%, t-50 мин.) + «Белизна» (50%, t-5 мин).

Использование в качестве предобработки препарат Экоцид С зараженность составляет 2,4% бактериальная и 2,3% грибная инфекция. "БиоПаг" снижает инфекцию до 12,2% и 2,4% соответственно.

Через 4 суток после диссекции стерильные семена начали прорастать. В некоторых случаях образовывался только корень или побег, но затем в течение 2-3 недель формировалось полноценное растение.

Поскольку одной из задач исследований является получение краснелистных «маркерных» гибридных генотипов, то на этапе прорастания и развития зародышей произвели отбор данных форм. Так, на начальных этапах развития семян можно было фиксировать пигментированный корень или в некоторых случаях каллусную ткань.

Через 14 дней культивирования семян после диссекции семядолей установили, что данный метод позволяет получить до 65,3% гибридных растений (максимально в комбинации *Malus sieboldii* x Малыш Будаговского). Проросшие семена без диссекции служили контролем (4,2%). Наименьшее количество развивающихся зародышей зафиксировали в комбинации *Malus sieboldii* x 76-3-6 (55,0%), при полном отсутствии развития в контроле.

Выводы

Таким образом, установлено, что дополнительная предобработка препаратами Экоцид С (1,0%) и «БиоПаг» (0,4%) в течении 50 минут способствует получению стерильных эксплантов до 61,5% по сравнению с контролем.

Применение диссекции семядолей позволяет получить до 65,3% гибридных растений по сравнению с 4,2% с контролем.

Список литературы:

1. Винницкая В.Ф. Технология функциональных и специализированных продуктов питания с использованием адаптивного сортимента местного растительного сырья: монография / В.Ф. Винницкая, О.В. Перфилова. – Мичуринск: изд-во Мичуринского государственного аграрного университета, 2018. – 184 с.
2. Влияние подвоя на морфометрические показатели привойного компонента в питомнике / Н.Л. Чурикова, Р.В. Папихин, З.Н. Тарова, Л.В. Скороходова, Д.Ю. Честных // Вестник МичГАУ. – 2014. - № 5. -С. 14-19.
3. Кирина И.Б. Лечебное садоводство: учебное пособие. Сер. 11 Университеты России (2-е изд.) / И.Б. Кирина, И.А. Иванова, Н.С. Самигуллина. - М.: Издательство Юрайт, 2019- 164 с.
4. Оценка новых клоновых подвоев яблони селекции Мичуринского аграрного университета в питомнике конкурсного испытания / М.Л. Дубровский, Р.В. Папихин, А.В. Кружков, Н.Л. Чурикова, Л.В. Скороходова // Сб.: Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК: материалы XVI Международной научной конференции. - Брянск, 2019. - 614-618 с.
5. Оценка способности к укоренению подвойных форм яблони в условиях *in vitro* / Н.Л. Чурикова, Д.О. Горлов, С.А. Муратова, Р.В. Папихин, З.Н. Тарова // Сборник научных трудов, посвященный 85-летию Мичурин-

ского государственного аграрного университета. В 4-х томах. - Мичуринск, 2016. - С. 271-277.

6. Папихин Р.В. Устойчивость клоновых подвоев яблони к парше на естественном инфекционном фоне / Р.В. Папихин, М.В. Маслова // Плодоводство и виноградарство Юга России. - 2016. - № 42 (6). - С. 13-22.

7. Перфилова О.В. Новые технологии продуктов для здорового питания населения Тамбовской области / О.В. Перфилова, В.А. Бабушкин // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. - 2017. - № 4. - С. 51-55.

8. Перфилова О.В. Технологические особенности производства фруктового полуфабриката из вторичного сырья сокового производства / О.В. Перфилова / Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. - 2017. - № 4. - С. 56-60.

9. Ресурсосберегающая технология переработки яблок / О.В. Перфилова, В.А. Бабушкин, В.В. Ананских и др. // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК - продукты здорового питания. - 2017. - № 6 (20). - С. 21-28.

10. Статистический анализ цитоморфологических признаков у отдаленных гибридов яблони и груши F1 И F2 (*Malus x pyrus*) из искусственных и спонтанных обнажений / Р.В. Папихин, М.Л. Дубровский // Сб.: Proceedings of the International Scientific and Practical Conference (ISPC 2019). Сер. «Advances in Intelligent Systems Research», 2019. - С. 363-367.

11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. –Vol.5., № 95 – P.473-497.

12. Quality of jelly marmalade from fruit and vegetable semi-finished products / O.V. Perfilova, V.A. Babushkin, G.O. Magomedov, M.G. Magomedov // *International Journal of Pharmaceutical Research.* - 2018. - Т. 10. - № 4. - С. 721-724.

UDC 577.114 : 581.143.6

**METHODS FOR INTRODUCING DISTANT HYBRIDS *MALUS*
SIEBOLDII INTO *IN VITRO***

Papikhin Roman Valerievich

Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor

parom10@mail.ru

Muratova Svetlana Alexandrovna

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor

smuratova@yandex.ru

Dubrovsky Maxim Leonidovich

Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor

element68@mail.ru

Grigorieva Elena Viktorovna

Graduate student

grigorieva-elena1615@yandex.ru

Michurinsk State Agrarian University

Michurinsk, Russia

Annotation. A protocol for the introduction into *in vitro* culture of hybrid seeds of *Malus sieboldii* obtained in different combinations of crossing is proposed. It was found that additional pretreatment with Ecocid C (1.0%) and BioPag (0.4%) preparations for 50 minutes facilitates the production of sterile explants up to 61.5% compared to the control. The use of dissection of cotyledons makes it possible to obtain up to 65.3% of hybrid plants compared to 4.2% with the control.

Key words: *Malus sieboldii*, distant hybridization, *in vitro* culture, sterilizing agent.