

УДК 34.31.33

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ГИБРИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ
В РЕЗУЛЬТАТЕ РАЗНОХРОМОСОМНЫХ СКРЕЩИВАНИЙ
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЮ *IN VITRO***

Алексей Андреевич Привалов

аспирант

asher_satton@mail.ru

Роман Валерьевич Папихин

руководитель Научного центра биотехнологии и селекции

rom10@mail.ru

Роман Александрович Чмир

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

romanchmir3@mail.ru

Мичуринский государственный аграрный университет

г. Мичуринск, Россия

Аннотация. При клональном микроразмножении наиболее полно реализуется регенерационный потенциал первичных меристем. Это особенно важно для размножения ценных гибридных генотипов. Отработка основных этапов размножения *in vitro* является первым и обязательным условием применения в промышленных масштабах любых биотехнологий, связанных с регенерацией целого растения. Для изучения и размножения гибридов яблони, полученных в результате разнохромосомных скрещиваний, необходима разработка высокоэффективной технологии микроклонального размножения с оптимизацией условий на всех этапах культивирования.

Ключевые слова: биотехнология, *Malus Domestica*, микроразмножение.

При клональном микроразмножении наиболее полно реализуется регенерационный потенциал первичных меристем. Это особенно важно для размножения ценных гибридных генотипов. Отработка основных этапов размножения *in vitro* является первым и обязательным условием применения в промышленных масштабах любых биотехнологий, связанных с регенерацией целого растения. Для изучения и размножения гибридов яблони, полученных в результате разнохромосомных скрещиваний, необходима разработка высокоэффективной технологии микрклонального размножения с оптимизацией условий на всех этапах культивирования.

Целью исследований является: исследовать способность гибридов, полученных в результате разнохромосомных скрещиваний микроразмножению *invitro*.

Объекты и методы исследований

Биологическими объектами исследований служили гибридные растения, полученные в результате разнохромосомных скрещиваний в комбинации 2-15-2 x 25-37-45 (4х). Контролем служила материнская форма 2-15-2 или патентное название «Мичуринск-12», который является карликовым клоновым подвоем яблони.

Гибридные семена на предыдущих этапах исследований были введены в культуру *invitro* и предварительно отобраны, как потенциально триплоидные генотипы.

Для культивирования данных форм *invitro*, использовали минеральную основу питательной среды QL (Quorin, Leroivre, 1977) с добавлением 30 г/л сахарозы и 8 г/л агара при pH 5,5-5,7. На этапе введения и микроразмножения использовали регуляторы роста растений: 6-бензиламинопурин (6-БАП) - 0,5 мг/л, β-индолилуксусную кислоту (ИУК) – 0,05 мг/л и комплекс витаминов по Мурасиге-Скугу.

pH питательной среды в процессе приготовления устанавливали в пределах 5,6-5,8 с помощью децинормального раствора NaOH. Среды стерилизовали автоклавированием (1 атм., 20 мин.). Витамины и регуляторы

роста растений стерилизовали фильтрованием и добавляли после автоклавирования (“Millipore” 0,22 μm , France).

Статистическую обработку данных проводили в программной среде MicrosoftExcel.

Результаты исследований

Предварительный отбор триплоидных генотипов проводили по морфологическим признакам характерным для полиплоидных растений, в частности яблони. Согласно литературным данным [2, с 26] и нашим исследованиям полиплоидные представители рода *Malus* имеют большее количество листьев и их более округлую форму, более сдержанный рост, сближенные междоузлия по сравнению с диплоидными представителями этого таксона.

После скрининга гибридных растений по признакам изменения морфометрических показателей проводили отбор по количеству хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. В результате этих двух предварительных анализов были отобраны формы, имеющие признаки триплоидных растений.

Анализ эффективности пролиферации микрочеренков гибридных форм показал значительные различия отобранных растений (рис. 1). Значения признака образования новых побегов из пазушных почек достоверно различалось и варьировало от $2,7 \pm 0,4$ шт. у 2А-7 до $3,4 \pm 0,5$ шт. у 2А-5. Все исследуемые формы обладали коэффициентом размножения ниже контрольного генотипа. Такой результат вполне закономерен, учитывая происхождение гибридов.

Отцовская форма 25-37-45 представляет собой тетраплоидный генотип, получена при скрещивании сортов Орловская гирлянда ($2n$) X Уэлси тетраплоидный ($4n$), относящихся к яблоне домашней (*Malus domestica* Mill). Существует множество данных [1, с 33], указывающих на то, что представители *Malus domestica* Mill. имеют более низкий коэффициент размножения в культуре ткани, по сравнению с подвойными формами рода *Malus*, которые получены от

сложных межвидовых скрещиваний видов *M. Niedzwetzkyana*, *M. pumila*, *M. prunifolia*, как и 25-37-45.

Несмотря на то, что ожидаемо гибридные растения будут иметь низкий показатель пролиферации, выделены генотипы (2а-1, 2а-2, 2а-5), которые по данному признаку близки к контрольной подвойной форме. Коэффициент размножения у этих микрорастений лежит в пределах погрешности среднего значения 2-15-2.

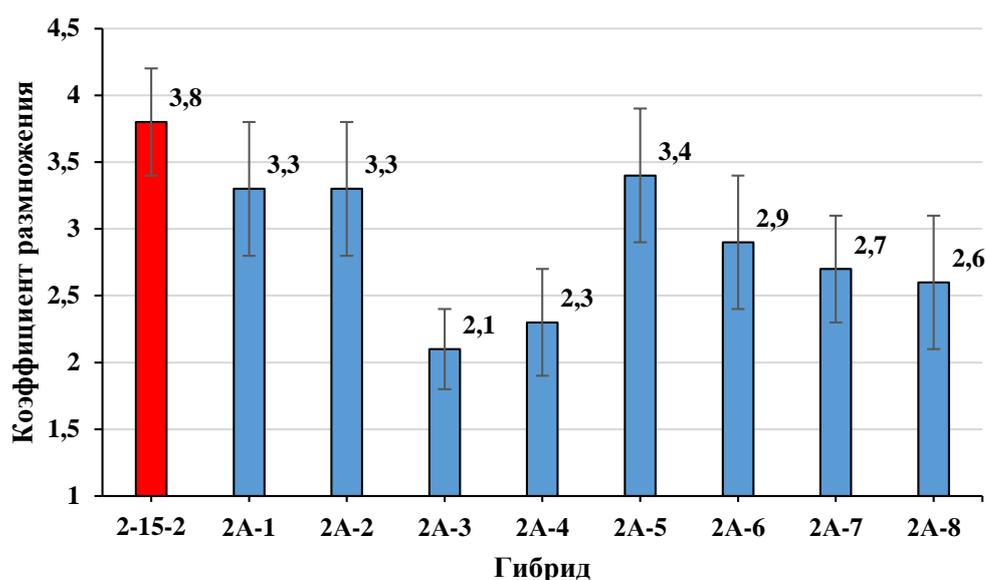


Рисунок 1 - Эффективность микроразмножения генотипов, полученных в комбинации 2-15-2 x 25-37-45 (4х) на питательной среде MS с 0,5 мг/л 6-БАП, ИУК – 0,05мг/л.

Исследование статистических характеристик этапа пролиферации конкретных генотипов позволяет более полно оценить биологический потенциал и дать объективную оценку возможности использования в производстве.

Близкие значения к контролю подтверждает и характер распределения признака пролиферации. На рисунке 2, видно, что кривые форм 2а-1, 2а-2, 2а-5 по характеру близки к контролю и имеют пик в одной области, но микрочеренков с коэффициентом размножения 1-2 шт./эксплант больше, что в среднем снижает показатель пролиферации.

Тем не менее, вероятно, подбор питательной среды позволит более эффективно использовать биологический потенциал гибридных генотипов и

повысить эффективность микроразмножения до уровня контрольных значений. Это предположение вытекает из высокого процента микрочеренков, указанных гибридов, образующих большое количество побегов, на уровне лучших клоновых подвоев.

Обратная картина наблюдается у гибридов с низким коэффициентом размножения (2а-3, 2а-4, 2а-7), когда большинство эксплантов не размножаются или формируют небольшое количество побегов (рисунок 2).

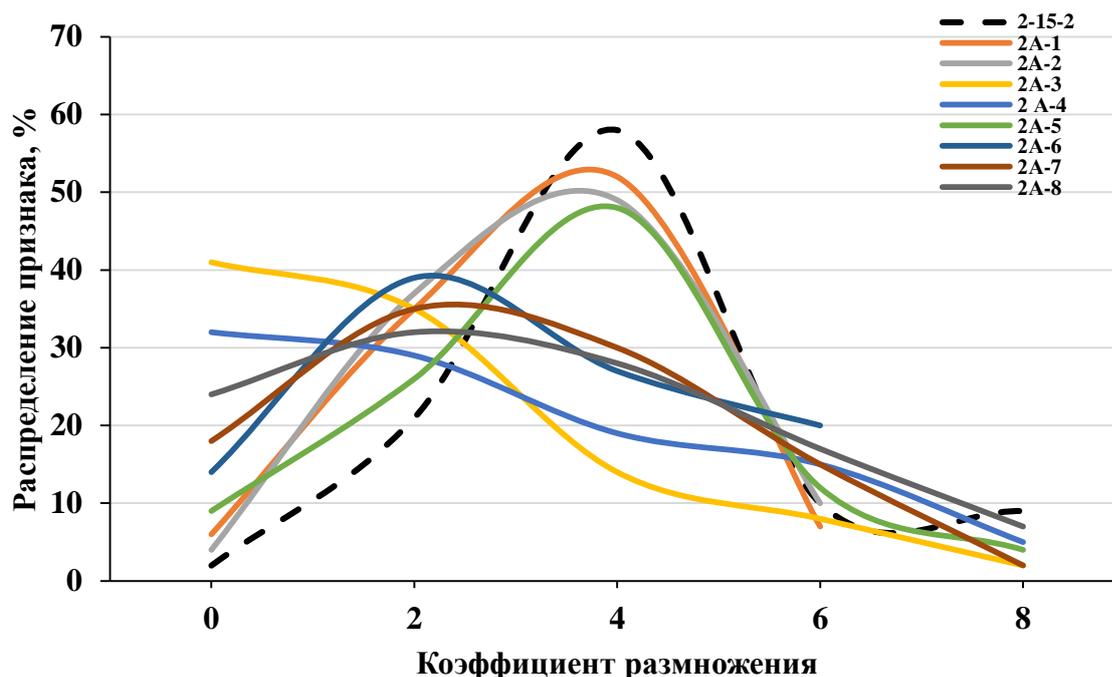


Рисунок 2 - Статистические характеристики пролиферации гибридов на питательной среде MS с 0,5 мг/л 6-БАП, ИУК – 0,05мг/л

Анализ всей отобранной гибридной популяции по данному признаку показал, что преобладающая часть форм значительно хуже размножается на питательной среде MS, чем подвойная материнская форма 2-15-2 (рис. 3). Лишь некоторые генотипы могут сформировать 6-8 микропобегов/эксплант, т.е. обладают потенциалом близким к контролю.

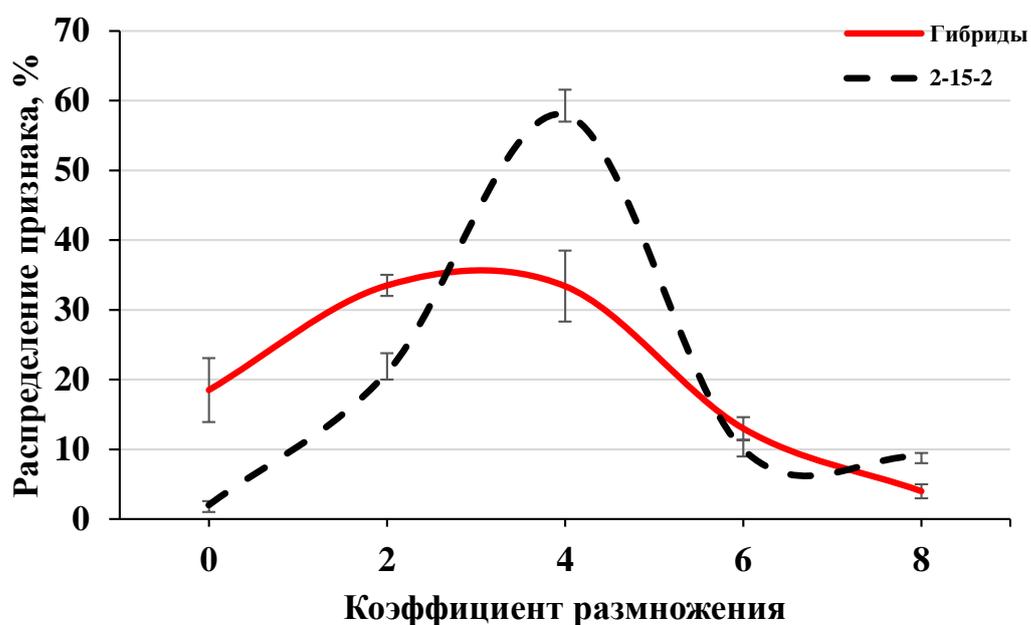


Рисунок 3 - Статистические характеристики пролиферации всех гибридов, полученных в комбинации 2-15-2 x 25-37-45 (4х)

Известно, что у многих культур при клональном микроразмножении значения коэффициента размножения тесно коррелирует с длиной побегов. Это связано с разными стратегиями биологического ответа на различные стимулирующие факторы, контролируемые генетическими механизмами. В одном случае, микрочеренки формируют большое количество побегов из пазушных почек, но имеют незначительную их длину, в другом, развивается эксплант за счёт собственного роста, утолщения микропобега, развития листьев и их количества, минимально образуя побеги. При этом, сырой вес эксплантов, в обоих случаях, может быть одинаковый.

Очевидно, что в пределах одной гибридной популяции, а с учётом использования в скрещиваниях генотипы с разным хромосомным составом в соматических и половых клетках и разными таксонами в пределах рода, то вероятность различной стратегии развития исследуемых гибридов, весьма высока. В пользу этого, как в нашем случае, так же указывает использование в скрещивании *Malus domestica*, с не высоким потенциалом пролиферации *in vitro* межвидового гибрида 2-15-2, являющимся клоновым подвоем с высоким морфогенетическим потенциалом, как *invivo*, так *invitro*.

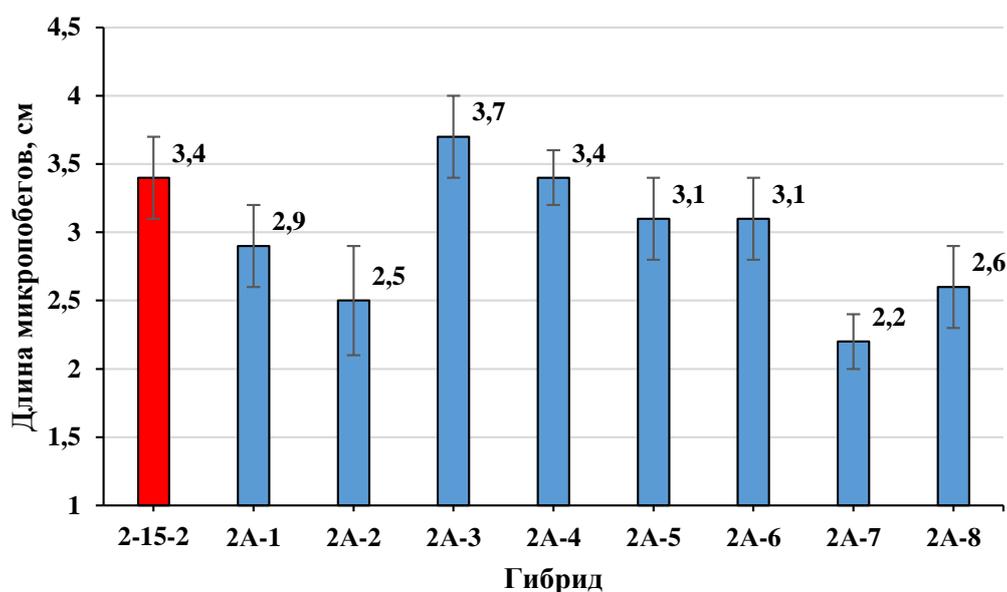


Рисунок 4 - Длина микропобегов гибридов, полученных в комбинации 2-15-2 x 25-37-45 (4х) на питательной среде MS с 0,5 мг/л 6-БАП, ИУК – 0,05 мг/л

Так, в нашем случае, корреляция коэффициента размножения и длины формирующихся побегов значительна ($r^2=0,82$), что указывает на наличие генотипов, реализующих обе биологические стратегии.

На рисунке 4, показано, что длина, образующихся побегов, значительно различается и варьирует от $2,2\pm0,2$ см до $3,7\pm0,3$ см. Максимальная длина побегов зафиксирована у генотипа 2A-3, но и как указано выше, имеющего наименьший коэффициент размножения (рис. 4, 5). Подобный результат зафиксирован у формы 2A-4 (рис. 4, 5).



а



б

Рисунок 5 - Гибриды на этапе микроразмножения: а - 2А-3; б - 2А-4

Наиболее оптимальным вариантом для клонального микроразмножения того или иного генотипа, является баланс количества формирующихся побегов на экспланте с их развитостью (длина, толщина, количество междоузлий и т.д.).

В нашем случае наиболее подходящие для этого формы –2А-1, 2А-2 (рис. б).



а



б

Рисунок 6 - Гибриды на этапе микроразмножения: а - 2А-1; б - 2А-2

Стоит отметить гибридную форму 2А-5, которая также имеет высокий коэффициент размножения, по сравнению с другими гибридами, хорошо

развитые вторичные побеги, но при этом существует явная проблема физиологической реакции на химический состав питательной среды (рис. 7). На протяжении всего этапа культивирования на среде MS проявляется реакция витрификации - гипергидричность. Витрификация выражается в утолщении листьев и побегов, увеличении содержания воды в тканях и усилении ломкости стебля микрорастения. На микроморфологическом уровне ее проявления характеризуется увеличением размеров клеток их излишнем растяжении вследствие недостаточного уровня лигнификации клеточной стенки [3, с 1]



Рисунок 7 - Витрификация микропобегов у гибрида 2А-5

Таким образом, проявление у эксплантов негативных эффектов культивирования *invitro*, таких как витрификация, хлорозность листьев, скрученность листьев, некротизация тканей, требует совершенствования методов культивирования, подбора состава питательных сред и внешних условий.

Выводы

Проведён анализ гибридных форм яблони, полученных от разнохромосомного скрещивания по способности к размножению в условиях *invitro* на среде MS.

Определён потенциал конкретных гибридов к пролиферации *invitro*.

Наилучшие показатели побегообразования отмечены у форм 2А-1, 2А-2.

Установлена необходимость более тщательного подбора состава питательной среды для повышения эффективности клонального микроразмножения конкретных генотипов и снижения проявлений физиологической негативной реакции генотипов на культивирование *in vitro*.

Список литературы:

1. Невмержицкая Ю.Ю., Тимофеева О.А. Клональное микроразмножение растений: учебно-методическое пособие Казань: Казанский университет. 2012. 56 с.
2. Седова О.В. Морфология высших растений: Учебно-методическое пособие для студентов биологического факультета. Саратов. 2016. 68 с.
3. Супрун И.И., Насонов А.И., Степанов И.В., Савенко Е.Г. Способ снижения витрификации микрорастений ореха грецкого в культуре *in vitro*: патент на изобретение RU2 735 622С2, 2019.02.18. Заявка: №2019104602 от 2019.02.18, опуб. 2020.11.05 бюл. №4 1с.

UDC 34.31.33

INVESTIGATION OF THE ABILITY OF HYBRIDS OBTAINED AS A RESULT OF MULTICHROMOSOMAL CROSSES TO MICROPROPAGATE *IN VITRO*

Alexey A. Privalov

postgraduate student

Roman V. Papikhin

Candidate of Agricultural Sciences

Head of the Scientific Center of Biotechnology and Breeding

parom10@mail.ru

Roman A. Chmir

Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor

romanchmir3@mail.ru

Michurinsk State Agrarian University

Michurinsk, Russia

Annotation. In clonal micropropagation, the regenerative potential of primary meristems is most fully realized. This is especially important for propagation of valuable hybrid genotypes. The development of the main stages of in vitro propagation is the first and obligatory condition for the industrial application of any biotechnologies related to whole plant regeneration. For the study and multiplication of apple hybrids obtained as a result of multichromosomal crosses, it is necessary to develop a highly efficient technology of microclonal propagation with optimization of conditions at all stages of cultivation.

Key words: biotechnology, *Malus Domestica*, micropropagation.

Статья поступила в редакцию 05.09.2023; одобрена после рецензирования 16.10.2023; принята к публикации 27.10.2023.

The article was submitted 05.09.2023; approved after reviewing 16.10.2023; accepted for publication 27.10.2023.