

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО, БИОТЕХНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Известия ТСХА, выпуск 4, 2014 год

УДК 582.951.63:581.145.1

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОБРАБОТОК ВОДНЫМ РАСТВОРОМ КОЛХИЦИНА НА ИЗМЕНЕНИЕ ПРИЗНАКОВ У ДВУХ САДОВЫХ ГРУПП ЛЬВИНОГО ЗЕВА (*ANTIRRHINUM MAJUS* L.)

А.В. ИСАЧКИН, А.А. СОЛОВЬЕВ, О.Е. ХАНБАБАЕВА,
В.Д. БОГДАНОВА, Е.Г. ЗАРЕНКОВА

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Установлено достоверное влияние обработки различными концентрациями водного раствора колхицина и генотипа сорта на количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Значительное влияние на изменение плоидности у растений львиного зева оказывает взаимодействие факторов (генотип и концентрация) — доля влияния 33%. Достоверное увеличение количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у среднерослых сортов происходило под действием 0,01% концентрации водного раствора колхицина, у карликовых сортов — под действием 0,002% концентрации. Установлена возможность определения плоидности у обработанных растений прямым методом, а также подтверждено, что в результате обработки водным раствором колхицина получены тетраплоидные растения львиного зева. Обработка растений водным раствором колхицина (0,01% концентрация) привела к существенному и достоверному снижению высоты растений у сортов двух изучаемых групп, а также отмечено существенное влияние на изменение размера цветка у карликовых сортов Том Тамб и Цвет Сакуры.

Ключевые слова: львиный зев, карликовые и среднерослые сорта, полиплоидия, тетраплоид, водный раствор колхицина, обработка.

Селекцией львиного зева впервые занялись в XIX в. немецкие ученые. Сейчас в мире выведено около 1000 разнообразных сортов и гибридов, но российской селекции среди них очень мало. Одним из перспективных направлений получения новых сортов у львиного зева является создание гибридов F1 и тетраплоидных сортов. Они обладают рядом преимуществ перед диплоидными растениями: крупным цветком и листьями, короткими междоузлиями, компактным кустом, устойчивостью к неблагоприятным условиям и др.

Материал и методика проведения исследований

Объектами исследования являются сорта двух садовых групп львиного зева — карликовой и среднерослой. Карликовые сорта — Цвет Сакуры и Том Тамб — характеризуются компактным кустом, цветками среднего размера. У сорта Том Тамб высота растений до 35 см, цветки зигоморфные, имеют разнообразную окраску от белой до пурпурной. У сорта Цвет Сакуры высота составляет 23 см, цветки имеют розово-белую окраску, листья пестрые с белыми и кремовыми штрихами и пятнами. Среднерослый сорт Монарх достигает в высоту 45 см, имеет крупные цветки чистой окраски от белой до темно-бордовой. Сорт Клоуны высотой 50 см, характеризуется цветками яркой двуцветной окраски.

Растения выращивали по стандартной технологии, высаживали в грунт после 25 мая по схеме 20х20 см на хорошо освещенном опытном участке с плодородной почвой. Каждый сорт был представлен 150 растениями в трех повторностях (по 50 растений в повторности). Однократную обработку растений водным раствором колхицина проводили в фазу первых настоящих листьев. В качестве контроля применяли обработку растений водой. Каждой концентрацией колхицина обрабатывали по 30 растений в трех повторностях, всего по 90 растений каждого сорта. Изучали влияние трех концентраций — 0,002, 0,01 и 0,05% водного раствора колхицина, опрыскивая ими первую пару настоящих листьев.

Обработанные растения были высажены в грунт для дальнейших наблюдений — изучения изменения размеров цветков, листьев, высоты растений, сроков цветения, выпадов.

Для подбора оптимальной концентрации проводили подсчет хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у трех произвольно отобранных растений в каждом сорте, а также применяли прямой метод цитологического анализа — подсчет хромосом в клетках корня.

Для изучения изменения признаков с каждой делянки произвольно отбирали по 10 учетных растений, измеряли их высоту и размер цветка в сантиметрах.

Данные обрабатывали при помощи программы Excel, применяя двухфакторный анализ, а также оценивая достоверность изменения признаков, доли влияния и взаимодействия факторов.

Результаты и их обсуждение

У львиного зева число хромосом в соматических клетках представлено 16, 18 и 32 хромосомами [3]. Тетраплоидные сорта ($4n = 32$) львиного зева уже получены у высокорослых срезочных сортов. Характерными признаками увеличения плоидности у растения являются короткие междоузлия, крупные цветки, плотное соцветие, гофрированные края лепестков цветков [1, 2].

Кратное увеличение числа хромосом в клетках (полиплоидия) может возникать под действием высокой или низкой температуры, ионизирующих излучений, химических веществ, а также в результате изменения физиологического состояния клетки [1,4].

В наших исследованиях обработку растений проводили водным раствором колхицина в различных концентрациях с целью получения полиплоидных форм у растений львиного зева.

Существуют две группы методов выявления полиплоидных растений: прямые (подсчет числа хромосом) и косвенные (по изменениям морфологических или цитологических признаков).

Поскольку увеличение илоидности у растений приводит, как правило, к сокращению междоузлий и снижению общей высоты растений, а также к укрупнению размеров цветка, уменьшению расстояний между цветками, иногда к увеличению размера листьев, то наиболее наглядно можно продемонстрировать влияние концентраций водного раствора колхицина на примере среднерослых сортов львиного зева универсального назначения, таких как Клоуны и Монарх, имеющих схожие морфологические признаки и полученных одной семеноводческой фирмой (Suttons, Англия). У карликовых сортов сильно развито боковое ветвление, поэтому оценить влияние обработок на снижение высоты визуально практически невозможно. Поэтому в исследованиях использовали и карликовые — Том Тамб и Цвет Сакуры, а также среднерослые сорта львиного зева (таблица).

**Количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц
у карликовых и среднерослых сортов львиного зева, 2013 г.**

Вариант	Растение			Среднее по варианту
	1-е	2-е	3-е	
<i>Клоуны</i>				
Контроль	14,80	15,80	14,00	14,87
0,05% р-р	15,13	14,97	14,90	15,00
0,01% р-р	23,57	23,03	23,47	23,36
0,002% р-р	19,07	18,87	18,90	18,94
<i>Монарх</i>				
Контроль	19,90	19,60	18,80	19,43
0,05% р-р	19,80	18,90	18,77	19,16
0,01% р-р	20,90	24,00	20,57	21,82
0,002% р-р	18,83	18,53	19,40	18,92
<i>Том Тамб</i>				
Контроль	14,27	15,03	14,80	14,70
0,05% р-р	14,33	15,00	18,47	15,93
0,01% р-р	18,80	17,60	18,93	18,44
0,002% р-р	23,15	23,06	15,21	20,47

Вариант	Растение			Среднее по варианту
	1-е	2-е	3-е	
<i>Цвет Сакуры</i>				
Контроль	16,80	17,03	16,40	16,74
0,05% p-p	23,00	20,79	25,07	22,95
0,01% p-p	20,80	20,37	20,43	20,53
0,002% p-p	19,39	23,50	29,97	24,29
Результаты				
Источник вариации				HCP ₀₅
Фактор А (сорт)				1,06
Фактор В (концентрация колхицина)				1,06
Взаимодействие факторов А x В				2,54

Доля влияния фактора А (генотип сорта) на количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц составляет 18%, фактора В (концентрация) — 29%, доля взаимодействия этих факторов — 33%. На случайные факторы приходится 20%. Доля случайных факторов велика и, возможно, связана с тем, что из группы обработанных растений отбирали произвольно по три для проведения учетов и наблюдений.

Наиболее заметное увеличение количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у среднерослых сортов Монарх, Клоуны было во 2-м варианте при 0,01% концентрации, менее выраженное — при 0,002%. У низкорослых сортов Том Тамб и Цвет Сакуры, наоборот, максимальное увеличение количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц отмечено в третьем варианте, при 0,002% концентрации колхицина (рис. 1).

При 0,05% концентрации раствора колхицина увеличения числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц не отмечено. Следовательно, 0,05% раствор на сортах Клоуны, Монарх и Том Тамб неэффективен.

Данные по сорту Цвет Сакуры отличались от остальных результатов, так как этот сорт характеризуется пестролистностью (рис. 2). Увеличение числа хлоропластов у сорта Цвет Сакуры дали все концентрации раствора колхицина. Самое большое количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц в листьях сорта Цвет Сакуры было отмечено у вариантов, обработанных 0,05% и 0,002% концентрациями (рис. 3). Различия между вариантами достоверны (HCP₀₅ = 1,6).

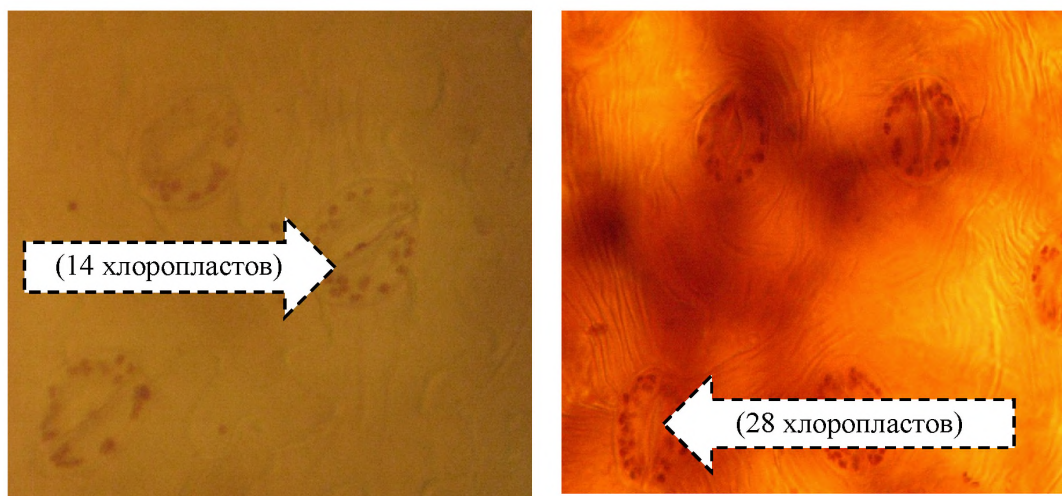


Рис. 1. Хлоропласты в замыкающих клетках устьиц у карликового львиного зева сорта Том Тамб у контроля (слева) и варианта с 0,002% концентрацией (справа)



Рис. 2. Сорт карликового львиного зева Цвет Сакуры (оригинатор РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2012 г.)

Обработка растений мутагенами может негативно повлиять на рост и развитие растений и вызвать их гибель [4]. Как видно из рисунка 4, концентрации по-разному повлияли на выпавшие у растений. У сорта Клоуны количество выпавших растений увеличивается с уменьшением концентрации раствора колхицина. У сорта Монарх все концентрации колхицина не повлияли на жизнеспособность растений, поэтому наибольшее количество выпавших растений приходится на контрольный вариант.

У карликовых сортов результаты более однородны: наиболее губительной для растений оказалась 0,01% концентрация колхицина. Но для сорта Том Thumb остальные концентрации оказали стимулирующее воздействие, в то время как у сорта Цвет Сакуры 0,05% концентрация угнетала растения, а 0,002% оказывала стимулирующее воздействие (рис. 4).

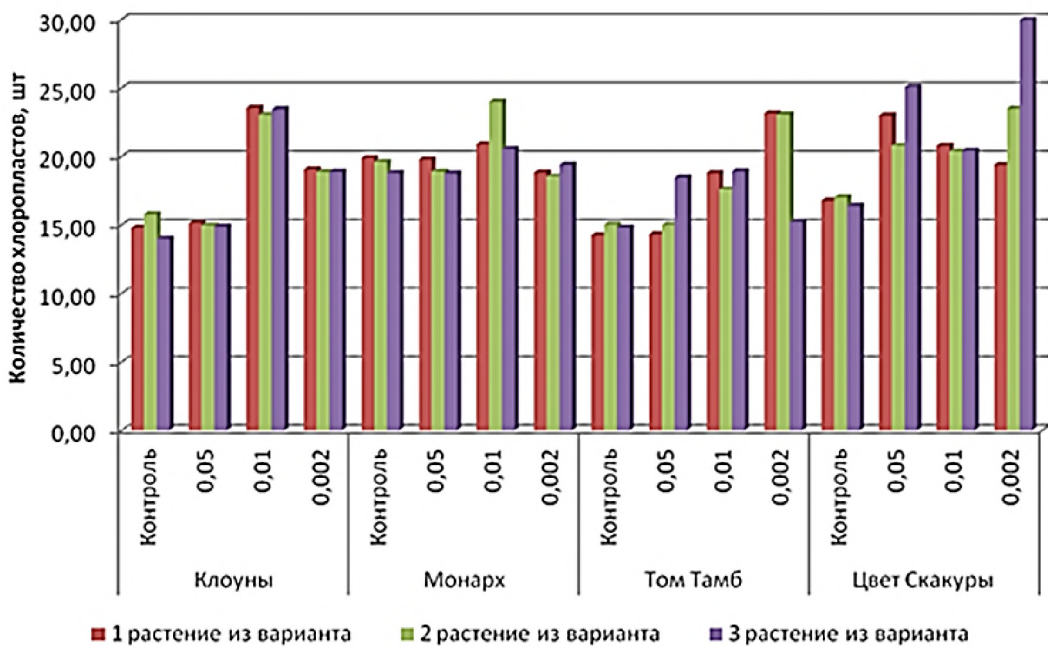


Рис. 3. Количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у исследуемых растений львиного зева, шт. (2012 г.)

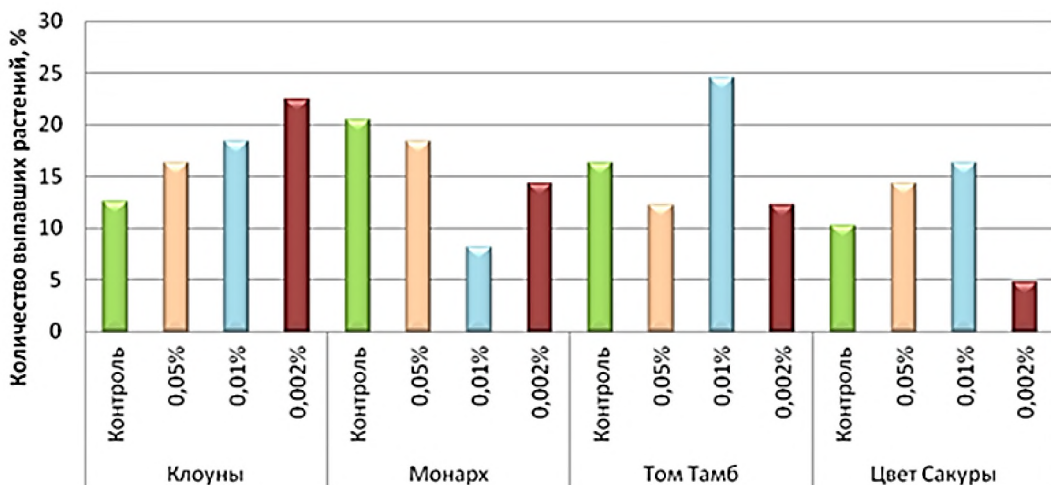
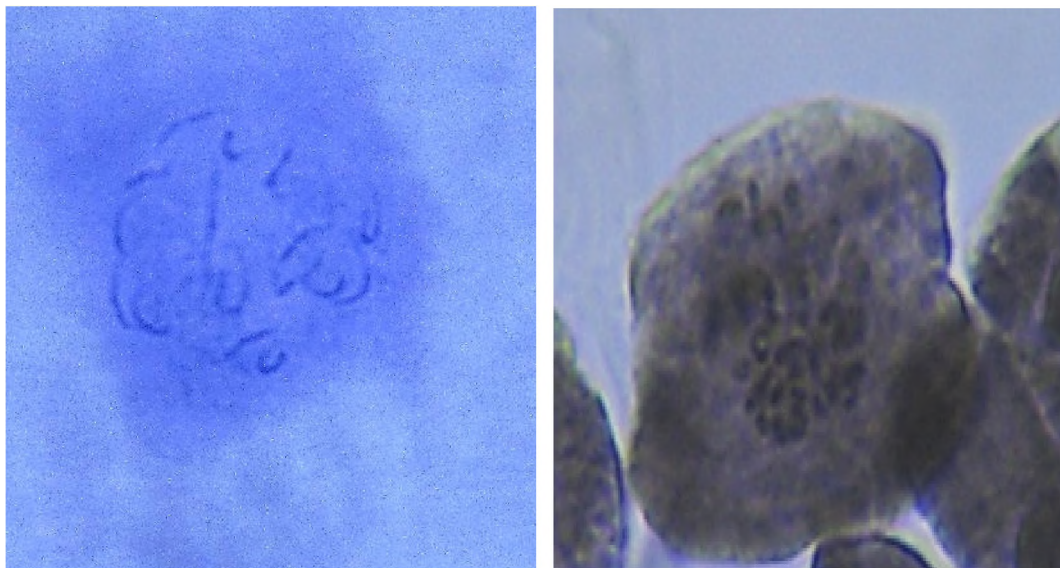


Рис. 4. Выпады растений львиного зева через 90 дней после обработки водным раствором колхицина, % (2012 г.)

Концентрации колхицина для сильного угнетения растений слишком малы, поэтому значительные потери растений начались не сразу после обработки, а через 3-4 нед. у карликовых сортов, через 1,5-2 мес. у среднерослых сортов. Это свидетельствует о длительном последствии колхицина.

После проведения косвенного метода изучали набор хромосом прямым методом в активно делящихся клетках молодых корешков путем распластывания (рис. 5А).



А ($2n = 16$)

Б ($4n = 32$)

Рис. 5. Диплоидные (А) и тетраплоидные (Б) наборы хромосом у сорта Том Тамб

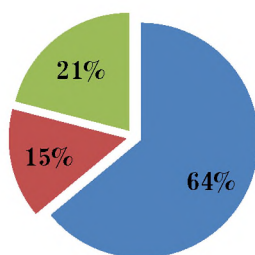
В результате были найдены метафазные пластинки, на которых удалось подсчитать набор хромосом (рис. 5).

Среди изучаемых растений мы смогли выделить несколько тетраплоидов, которые по внешним признакам довольно заметно отличались от остальных опытных растений. Интересные формы карликового и среднерослого львиного зева были отобраны для дальнейшей селекции и анализа признаков в условиях открытого грунта.

В 2013 г. на опытном участке были высажены растения четырех сортов, описанных выше. Каждого сорта посадили по 20 учетных растений, предварительно обработанных 0,01 % концентрацией водного раствора колхицина. Данную концентрацию мы считаем оптимальной для получения полиплоидных растений у львиного зева. Измерения снимали с 10 растений, выбранных произвольно. В качестве контрольных (диплоидных) использовали растения, выращенные без обработки и высаженные по аналогичной технологии на этом же опытном участке.

У растений изучали наиболее значимые признаки, характеризующие появление плоидности — снижение высоты растений, т.е. укорачивание междоузлий и изменение размеров цветка в сторону укрупнения (рис. 6).

■ Генотип сорта ■ Обработка колхицином
 ■ Случайная вариация



HCP_{05} генотип сорта (A) = 0,16; HCP_{05} наличие обработки (B) = 0,16

Рис. 6. Доли влияния факторов на измерение размеров цветка (ширину), см, у карликовых сортов львиного зева Том Тамб и Цвет Сакуры, 2013 г.

В результате проведения двухфакторного дисперсионного анализа установлено достоверное влияние генотипа сорта и способа обработки на размер (ширину) цветков у карликовых сортов львиного зева (Том Тамб, Цвет Сакуры). Доля влияния фактора А (генотип сорта) составила 64%, доля влияния фактора В (обработка колхицином) — 15%. Доля неконтролируемых факторов составила 21%. Взаимодействие факторов (генотип сорта и обработка) не оказало влияния на размер цветков львиного зева (рис. 6).

Из данных гистограммы на рисунке 7 видно, что растения сорта Цвет Сакуры достоверно имеют большие цветки (3,2 см), чем сорт Том Тамб (2,6 см) (рис. 7А).

Отмечено, что наибольшие цветки (3,0 см) получены у обоих сортов при обработке колхицином (рис. 7Б).

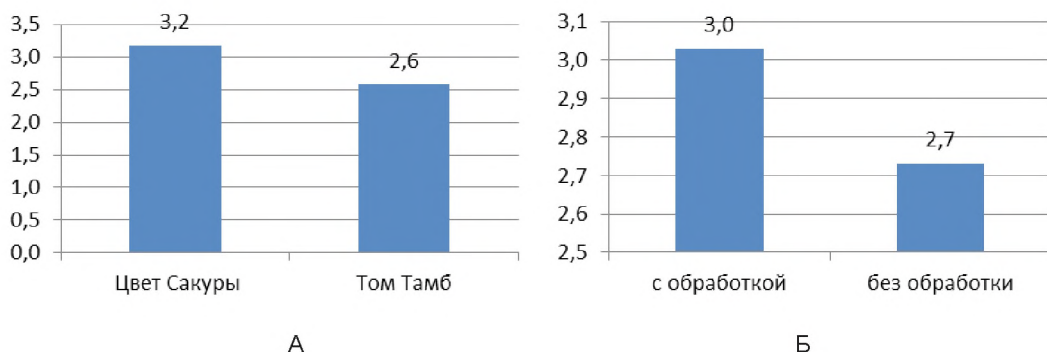


Рис. 7. А — влияние генотипа растений на размер цветка (ширину), см; Б — влияние обработки водным раствором колхицина на размер цветка (ширину), см

Кроме изменения размеров цветка в сторону укрупнения, возможно изменение высоты растений в сторону уменьшения. В результате проведения двухфакторного дисперсионного анализа установлено достоверное влияние фактора А (генотипа сорта) и фактора В (способа обработки) на высоту растений карликовых сортов львиного зева. Доля влияния фактора А (генотип сорта) составила 59%, доля влияния фактора В (обработка колхицином) — 27%. Доля неконтролируемых факторов составила 14% (рис. 8). Взаимодействие факторов не оказало влияния на изменение высоты растений изучаемых сортов.



HCP_{05} генотип сорта (А) = 0,9; HCP_{05} наличие обработки (В) = 0,9

Рис. 8. Доли влияния факторов на высоту растений у карликовых сортов львиного зева, см (2013 г.)

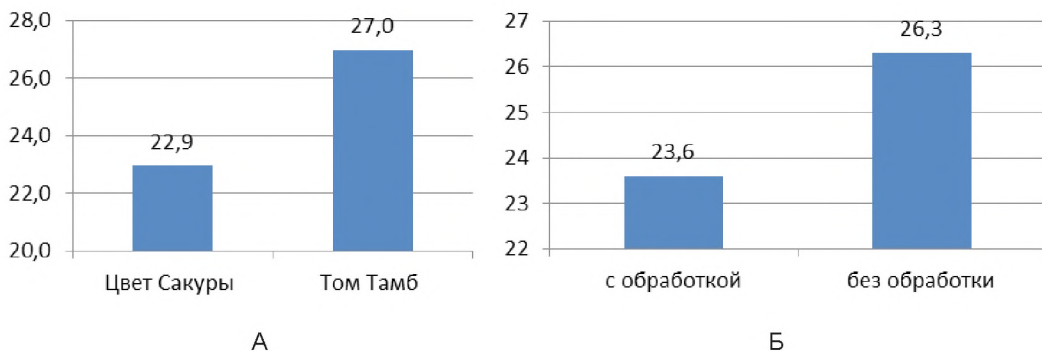
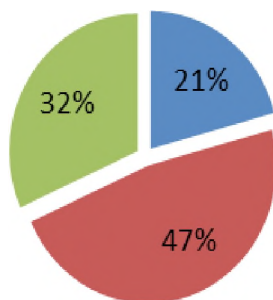


Рис. 9. А — влияние генотипа растений на высоту растений, см; Б — влияние обработки водным раствором колхицина на высоту растений, см

Из данных гистограммы на рисунке 9 видно, что растения сорта Цвет Сакуры (А) достоверно ниже (22,9 см), чем растения сорта Том Тамб (27 см) (рис. 9А). Достоверно отмечено, что более низкие растения получены при обработке колхицином (рис. 9Б).

Аналогичные исследования были проведены в группе среднерослых или универсальных сортов (Клоуны и Монарх). На растениях данной группы косвенным методом или визуально по высоте и размеру цветка возможно отобрать тетраплоидные экземпляры, так как растения этой группы характеризуются достаточной высотой (40-55 см) и цветками среднего размера (до 3 см).

■ Генотип сорта ■ Обработка ■ Случайная вариация



HCP_{05} генотип сорта (A) = 0,13; HCP_{05} наличие обработки (B) = 0,13

Рис. 10. Доли влияния факторов на измерение размеров цветка (ширину) у среднерослых сортов львиного зева, см (2013 г.)

В результате проведения двухфакторного дисперсионного анализа установлено достоверное влияние генотипа сорта и способа обработки на размер (ширину в см) цветков у среднерослых сортов львиного зева Монарх, Клоуны. Доля влияния фактора А (генотип сорта) составила 21%, доля влияния фактора В (обработка колхицином) — 48%. Доля неконтролируемых факторов составила 32% (рис. 10). Возможно, такой высокий процент связан с меняющимися климатическими условиями в открытом грунте. Взаимодействие факторов не влияет на размер цветков львиного зева. Показано, что растения сорта Клоуны (3,0 см) достоверно имеют большие цветки, чем сорт Монарх (2,7 см) (рис. 11 А).

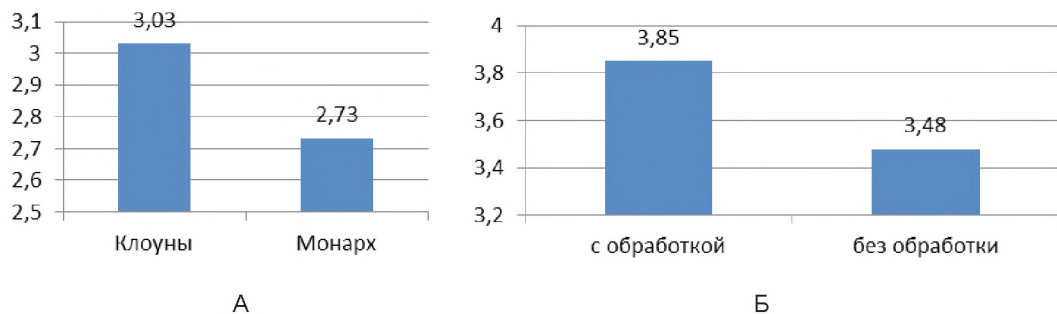


Рис. 11. А — влияние генотипа растений на размер цветка (ширину), см; Б — влияние обработки водным раствором колхицина на размер цветка (ширину), см, у среднерослых сортов Клоуны и Монарх, 2013 г.

Отмечено, что наибольшие цветки получены у обоих сортов при обработке колхицином (рис. 11Б).

Как и у низкорослых сортов, на среднерослых были отобраны растения, отличающиеся от остальных по высоте. Расчетные данные по ним представлены в диаграмме на рисунке 12.

Доля влияния фактора В (обработка колхицином) составила 81%, доля неконтролируемых факторов — 19% (рис. 12). Фактор А (генотип сорта) и взаимодействие (А × В) не влияют на высоту растений у среднерослых сортов львиного зева.

В результате проведения двухфакторного дисперсионного анализа установлено достоверное влияние фактора В (способа обработки) на высоту среднерослых сортов львиного зева (рис. 13).



HCP_{05} наличие обработки (В) = 1,07

Рис. 12. Доли влияния факторов на высоту растений у среднерослых сортов львиного зева, см (2013 г.)

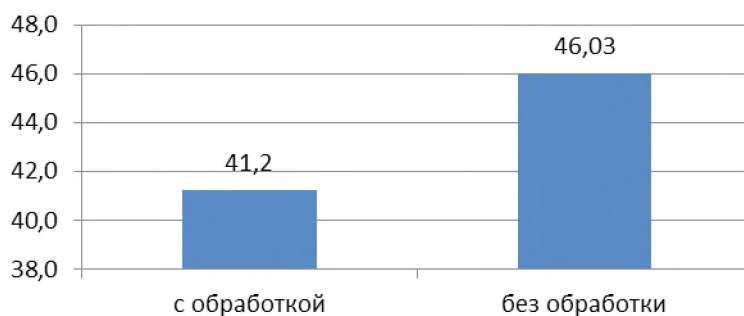


Рис. 13. Влияние обработки водным раствором колхицина на высоту растений у среднерослых сортов Клоуны и Монарх, см (2013 г.)

Достоверно установлено, что более низкие растения (41,2 см) среднерослых сортов получены при обработке 0,01% концентрацией водного раствора колхицина (рис. 13).

В результате наших исследований можно предположить, что у львиного зева, независимо от принадлежности к садовой группе, обработка 0,01% концентрацией водного раствора колхицина приводит к изменению плоидности некоторых растений и значимому снижению высоты и укрупнению размеров цветка по сравнению с контролем.

Выводы

1. Установлено достоверное влияние обработки различными концентрациями водного раствора колхицина и генотипа сорта на количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Значительное влияние оказывает взаимодействие факторов (генотип сорта и концентрация): доля влияния 33%, концентрация раствора 29%.

2. Для карликовых сортов наиболее губительной для растений оказалась 0,01% концентрация колхицина. У среднерослого сорта Клоуны максимальные выпады были при 0,002% концентрации, у сорта Монарх — при 0,05% через 40-90 дней выращивания.

3. Достоверное увеличение количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у среднерослых сортов происходило под действием 0,01% концентрации водного раствора колхицина, у карликовых сортов — под действием 0,002% концентрации.

4. Установлена возможность определения ploidy у обработанных растений прямым цитологическим методом, а также подтверждено, что в результате обработки водным раствором колхицина получены тетраплоидные растения львиного зева.

5. Обработка растений водным раствором колхицина (0,01% концентрация) привела к существенному и достоверному снижению высоты растений у сортов двух изучаемых садовых групп, а также отмечено существенное влияние на изменение размера цветка у карликовых сортов Том Тамб и Цвет Сакуры.

Библиографический список

1. Матвеева Т.С. Полиплоидия у декоративных растений // Тр. МОИП. 1962. Т. 5. С. 333-359.
2. Ханбабаева О.Е., Богданова В.Д., Заренкова Е.Г. Изучение биологии цветения и опыления сортов и линий карликового львиного зева (*Antirrhinum majus* L.) // Известия ТСХА. 2013. №5. С. 92-100.
3. Хромосомные числа цветковых растений. JL: Наука, 1969. 927 с.
4. Zhang X., Hua Y. The preliminary study on polyploid of *Antirrhinum majus* L. // Acta horticulturae sinica. 1990. Vol. 17. № 1. P. 76-80.

STUDYING THE INFLUENCE OF COLCHICINE AQUEOUS SOLUTION TREATMENT ON CHARACTERISTICS MODIFICATION OF TWO HORTICULTURAL GROUPS OF SNAPDRAGON (*ANTIRRHINUM MAJUS* L.)

A.V. ISACHKIN, A.A. SOLOVIEV, O.E. KHANBABAIEVA,
V.D. BOGDANOVA, E.G. ZARENKOVA

(RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev)

This article describes the effect of colchicine solution treatment and of genotype on the number of chloroplasts in stomata cells. Interaction of these two factors also has a significant impact on the number of chloroplasts in stomata cells (33%). Concentration of colchicine solution induced the increase of chloroplasts number was 0,01% for medium size varieties and 0,002% — for dwarf varieties. The possibility of determining the ploidy level of treated plants by the direct

method is noted in the article. Besides, this paper includes the description of tetraploid snapdragon plants resulting from colchicine solution treatment. Treatment with 0,01% colchicine solution led to substantial reduction of plants height in two groups of varieties. Also some changes in flowers size in dwarf varieties Tom Tamb and Tsvet Sakuri were observed.

Key words: snapdragon, dwarf and medium size varieties, poliploidy, tetraploid, aqueous solution of colchicine, processing.

Исачкин Александр Викторович — д. с.-х. н., проф. кафедры декоративного садоводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-10-65; e-mail: isaclikinalex@mail.ru).

Соловьев Александр Александрович — д. б. н., проф., зав. кафедрой генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 976-40-72; e-mail: genetic@timacad.ru).

Ханбабаева Ольга Евгеньевна — к. с.-х. н., доц. кафедры декоративного садоводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-10-65; e-mail: lianbabaeva@yandex.ru).

Богданова Варвара Дмитриевна — к. б. н., ст. преп. кафедры декоративного садоводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-10-65; e-mail: meecado@gmail.com).

Заренкова Екатерина Геннадьевна — асп. кафедры декоративного садоводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-10-65; e-mail: zarenkova89@mail.ru).

Isachkin Aleksandr Viktorovich — Doctor of Agricultural Sciences, professor of the department of ornamental gardening, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 977-10-65; e-mail: isaclikinalex@mail.ru).

Soloviev Aleksandr Aleksandrovich — Doctor of Biological Sciences, professor of the department of genetics and biotechnology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 976-40-72; e-mail: genetic@timacad.ru).

Khanbabaeva Olga Evgenievna — PhD in Agricultural Sciences, associate professor of the department of ornamental gardening, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 977-10-65; e-mail: hanbabaeva@yandex.ru).

Bogdanova Varvara Dmitrievna — PhD in Biology, senior lecturer of the department of ornamental gardening, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 977-10-65; e-mail: meecado@gmail.com).

Zarenkova Ekaterina Gennadijevna — PhD student of the department of ornamental gardening, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 49; tel. (499) 977-10-65; e-mail: zarenkova89@mail.ru).