

УДК 635.91:582.572.226:631.532

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ В СЕЛЕКЦИИ ТЮЛЬПАНОВ

Т.М. КОЛОМНЕЦ

(ВНИИЦСК)

В опытах определяли сроки изоляции зародышей тюльпанов от материнского растения и влияние степени их дифференциации на приживаемость в культуре *in vitro* на различных питательных средах с целью увеличения коэффициента вегетативного размножения. Определялись режимы культивирования при формировании микролуковичек.

Культура тюльпанов, имеющая большую историю, и в наше время является одной из ведущих в промышленном цветоводстве, которое начало развиваться в СССР, в том числе на Черноморском побережье Кавказа, с 1963 г., главным образом на импортном сорimente и посадочном материале. Но интродуцированные сорта, сформированные в иных экологических условиях, не полностью соответствовали почвенно-климатическим условиям выращивания во влажных субтропиках.

Поэтому в 1972 г. во ВНИИЦСК были начаты селекционные работы с целью выведения отечественных сортов тюльпанов, менее требовательных в культуре, более устойчивых к вредителям и болезням и более урожайных во влажно-субтропической зоне Черноморского побережья России

в сравнении с существующими.

В последние годы в селекционной практике предпочтение отдается межвидовой гибридизации как источнику получения сеянцев с широким диапазоном генетической изменчивости за счет вовлечения в новые сорта генов диких и полудиких видов. Однако при таких скрещиваниях растения зачастую продуцируют неполноценные семена, что тормозит селекционный процесс и затрудняет или сводит на нет усилия исследователей. Преодолеть несовместимость исходных родительских форм, предотвратить гибель зародышей на ранних этапах развития, а также получить полноценные гибридные растения и интенсифицировать селекционный процесс можно через использование культуры зародышей в условиях *in vitro*.

Первые работы по культуре изолированных зародышей выполняли E. Hannig [7], G. Stingl [8], K. Dieterich [6]. В наше время широко известны работы А.И. Здруйковской-Рихтер [1], использующей культуру репродуктивных органов в качестве метода селекции плодовых, косточковых и цветочных культур, в том числе тюльпанов [1—4]. Однако в последнем случае положительных результатов не удалось получить, что свидетельствует о сложности применения методов биотехнологии для селекции тюльпанов.

Исследования в этом направлении начаты нами в 1993 г. Цель их — выявить возможности метода культуры зародышей при отдаленных и разногенномных скрещиваниях тюльпанов для улучшения развития и повышения жизнеспособности гибридных семян, увеличения вегетативного размножения, ускорения селекционного процесса.

Методика

В качестве исходного материала использовали зародыши тюльпанов от 5 комбинаций скрещивания, которые помещали на агаризованную питательную среду, предварительно автоклавированную в течение 20 мин при 0,8 атм. Стерилизация растительного материала заключалась в промывке нераскрытой коробочки в проточной воде 1—1,5 ч, в мыльном растворе — 0,5 ч и проточной воде — 10—15 мин, в крепком растворе перманганата натрия — 15—

20 мин и в проточной воде — 10—15 мин. В качестве стерилизующего агента использовали дегмин в концентрации 0,2% при экспозиции 20 мин с последующей 4—5-кратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Перед изоляцией в условиях ламинарного бокса коробочки на 2—3 сек погружали в 96% спирт и обжигали в пламени спиртовки. Первые 10 дней после введения зародышей в условия *in vitro* пробирки с эксплантами держали в темноте при температуре 25° С.

Известно, что для успешного выращивания изолированных зародышей *in vitro* на ранней стадии большое значение имеют сроки их изоляции от материнского организма. Для каждой культуры они устанавливаются индивидуально. С целью определения наилучших сроков изоляции мы отбирали зародыши на 53—70-й день после опыления и высаживали их на питательную среду Ван-Гофа — всего 214 зародышей от 5 отдаленных и совместимых комбинаций скрещивания. Изучали характер их развития в зависимости от степени дифференциации в момент введения в культуру ткани.

Для пролиферации побегов из изолированных зародышей тюльпанов и дальнейшего формирования полноценных растений использовали модифицированную среду Мурасиге и Скуга, дополненную 6-БАП — 3,0 мг/л, НУК — 0,15 мг/л, 6% сахарозой и подращивали их при температуре 25±2° С, 16-часовом фотопериоде, освещенности 2—3 тыс. лк в культуральном помещении с автоматическим режимом.

Публикуется в рамках сотрудничества и обмена опытом.

Для получения микролуковиц *in vitro* культуральные сосуды переносили в темноту при пониженной температуре 4—9° С, из питательной среды исключали 6—БАП, а НУК заменяли на ИМК в концентрации 0,3—0,5 мг/л.

Результаты

Анализ развития зародышей на искусственной питательной среде показал, что на успех инкубации влияют исходные родительские формы и сроки изоляции зародышей. Так, в наших экспериментах лучшие результаты получены при использовании в качестве материнских сортов Торонто и Эприкот Бьюти, а оптимальным сроком изоляции оказались 53—56-й дни после опыления, когда преобладала торпедовидная стадия развития и размер их достигал 1,5—3 мм. В более ранние сроки зародыш в семяпочке не просматривался и извлечь его, не травмируя, было невозможно. У зародышей размером 1,5—3 мм процент приживаемости колебался от 48,7

до 90,3, и к 5-му месяцу они достигали размеров 10—50 мм. В случае же, когда размер зародыша в момент изоляции значительно превышал 3 мм (как в комбинации Лустиге Витве х Жаклин), около половины от числа введенных в культуру оказалась абортивной, не способной прорасти *in vitro*. Выход микролуковиц в межвидовых комбинациях Торонто х Мадам Лефебер и Торонто х 1489 составил 15,4; 16,1% к числу высаженных зародышей размером 1,5—3 мм и 9,5% из зародышей размером до 1 мм. В совместных комбинациях Лустиге Витве х Жаклин, Эприкот Бьюти х Жаклин-от зародышей 1,5—6 мм выход микролуковиц составил соответственно 15,1 и 39,9% (табл. 1). При этом было отмечено, что в отдельных комбинациях, как, например, Торонто х Мадам Лефебер, Эприкот Бьюти х Жаклин, зародыши одного возраста могли находиться в разных стадиях развития, что свидетельствует о гетерозиготности гибридного потомства.

Таблица 1

Развитие и формирование микролуковиц тюльпанов *in vitro* в зависимости от генотипа и степени дифференциации зародышей

Комбинация скрещивания	Число дней после опыления	Посажено экплантов, шт.	Размер экплантов в момент введения в культуру, мм	Прижилось экплантов, %	Размер экплантов через 5 мес, мм	Получено луковок, %
Лустиге Витве х Жаклин	70	35	3—6	51,4	8—45	15,1
Торонто х Мадам Лефебер	55	21	До 1	85,7	10—30	9,5
		34	1,5—3	90,3	10—45	16,1
Торонто х 1489	56	39	1,5—3	48,7	7—40	15,4
Эприкот Бьюти х Жаклин	53	18	До 1	55,6	12—25	5,6
		39	1,5—3	66,7	17—50	39,9
Крисмес Марвел х 1489	66	28	До 1	14,3	8—18	1,0

Таким образом, для получения жизнеспособных проростков и увеличения их выхода желательнее использовать в культуре ткани дифференцированные торпедовидные зародыши размером от 1,5 до 3 мм.

Далее, для достижения наибольшего числа регенирирующих по-

бегов от одного зародыша, в модифицированную питательную среду Мурасиге — Скуга добавляли 6-БАП и НУК, оптимальная концентрация которых была установлена в экспериментах, результаты которых, например, по комбинации Эприкот x Жаклин, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Развитие изолированных зародышей в комбинации Эприкот Бьюти x Жаклин

Регулятор роста, мг/л	Среда Мурасиге — Скуга модифицированная	
	полноценные растения, %	дополнительные проростки, %
6-БАП, 0,3 + НУК, 0,15	58,2	24,3
6-БАП, 0,15 + НУК, 1,5	20,0	18,4
6-БАП, 0,015 + НУК, 3,0	60,2	11,3
6-БАП, 3,0 + НУК, 0,15	89,4	38,5

Обогащению минеральной основы среды 6-БАП и НУК из расчета соответственно 3,0 и 0,15 мг/л позволило получить наибольшее количество полноценных растений (89,4%) и дополнительных проростков (38,5%).

В результате 4—6-кратного субкультивирования зародышей на модифицированную питательную среду Мурасиге — Скуга с добавлением 6-БАП и НУК вышеуказанных концентраций к 8-му месяцу они достигли высоты 10—20 см, а количество дополнительных проростков колебалось от 24,0 до 80,0% к числу высаженных зародышей (в условиях *in vivo* 2-летние сеянцы несут по одному побегу и выживаемость их колеблется в пределах 2—60% к числу посеянных семян [5]). Затем из питательной среды исключали цитокинины, которые, как известно, препятствуют ризогенезу, НУК

заменяли на ИМК и культивационные сосуды помещали на 9—12 нед в темноту при температуре 4—9°С для закладки микролуковичек. После чего регенеранты вновь переносили в культуральное помещение до полного формирования луковичек, которое длилось от 30 до 150 дней при указанном выше режиме (рис. 1).

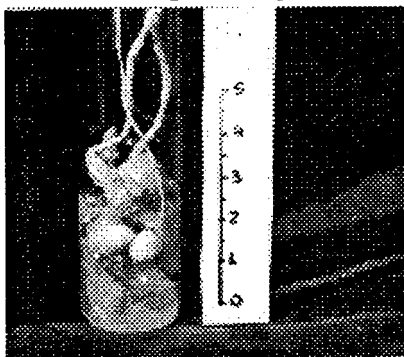


Рис. 1. Формирование луковичек в культуре *in vitro*.

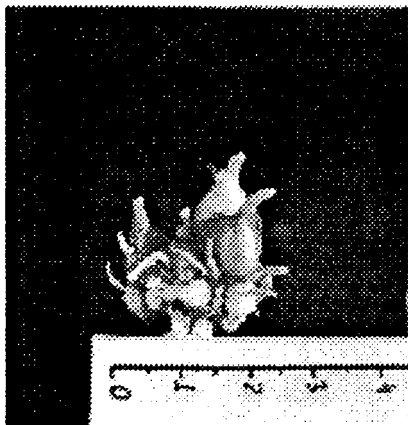


Рис. 2. Гнездо луковничек, полученных *in vitro* из одного зародыша.

Всего в 1993—1996 гг. нам удалось получить *in vitro* более 1 тыс. микролуковничек, диаметр которых колебался от 3 до 20 мм, а масса — от 0,1 до 0,7 г. Причем от одного зародыша в отдельных комбинациях образовалось до 20 микролуковничек (рис. 2), что является важным показателем при отборе перспективных форм на ранней стадии селекционного процесса.

Дальнейшее выращивание этих луковничек в открытом грунте не представляло больших трудностей и проводилось по общепринятой для тюльпанов технологии. Дружность всходов и хорошее развитие растений позволили сделать предварительную оценку полученных гибридов по отдельным признакам (рис. 3). Разработка показателей для ранней диагностики перспективных форм пока не завершена. Положительное решение этого вопроса позволит вести отбор элит уже в первые 2 года роста гибридных сеян-



Рис. 3. Всходы тюльпанов в возрасте 4 мес из луковничек, полученных *in vitro*.

цев, что значительно сократит селекционный процесс.

Выводы

1. Оптимальный срок изоляции зародышей от материнского организма тюльпанов — 53—56-й день после опыления.

2. Для получения жизнеспособных проростков и увеличения их выхода в культуре *in vitro* желательно использовать дифференцированные торпедовидные зародыши размером 1,5—3 мм.

3. Для формирования луковничек *in vitro* необходимо поддерживать температуру на уровне 4—9°С, высокое содержание сахарозы (до 6%) и концентрацию ИМК 0,3—0,5 мг/л в питательной среде. Последующее подращивание регенерантов следует проводить при температуре 25±2°С и 16-часовом фотопериоде не менее 20 дней.

4. Использование метода культуры зародышей тюльпанов *in vitro* улучшает развитие и жизнеспособность межвидовых и разногенных гибридов, увеличивает число вегетативных побегов и в результате — выход микролуковничек. Все это позволяет значи-

тельно сократить селекционный процесс, который для тюльпанов обычно длится не менее 20 лет.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Здруйковская-Рихтер А.И.* Культура изолированных зародышей и пути ее применения в биологических исследованиях. — В кн.: Культура изолированных органов, тканей и клеток растений / Тр. I Всерос. конфер. «Наука». 1970, с. 20—30. — 2. *Здруйковская-Рихтер А.И.* Культура изолированных зародышей и генеративных органов как метод селекции плодовых растений. — Науч. тр. ВАСХНИЛ «Тканевые

и клеточные культуры в селекции растений». М.: Колос, 1979, с. 57—70. — 3. *Здруйковская-Рихтер А.И.* Культура зародышей in vitro и получение новых форм растений. — Автореф. докт. дис. М., 1981. — 4. *Здруйковская-Рихтер А.И.* Культура in vitro зародышей хурмы от межвидовой гибридизации. — Бюл. Гл. бот. сада, М.: Наука, 1981, вып. 121, с. 84—86. — 5. *Мохно В.С.* Научные отчеты ВНИИЦиСК, 1972—1990 гг. — 6. *Dieterich K.* — Flora, 1924, Bd 17, S. 379—417. — 7. *Hannig E.* — Bot. Zeitung, 1904, Bd 62, S. 45—80. — 8. *Stingl G.* — Flora, 1907, Bd 97, № 3, S. 308—331..

Статья поступила 6 ноября 1996 г.

SUMMARY

Using the method of tulip embryo culture in vitro improves the development and increases the number of vegetative shoots, and as a result-formation of microbulbs, which makes the selection process that usually lasts in tulips not less than 20 years much shorter. For bulb formation in vitro it is necessary to keep lower temperature and high amount of saccharose in nutrient medium and to put into medium indolyl-butyric acid in concentration 0.3—0.5 mg/litre. Subsequent growing of regenerants should be carried out at temperature $25 \pm 2^\circ \text{C}$ and in 16-hour photoperiod for not less than 20 days.