УДК 635.252:631.147

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-343-11-125-128>

Оригинальное исследование/Original research

В.С. Романов¹,
О.В. Романова¹,
Л.И. Герасимова¹,
Т.М. Середин¹,
Н.А. Шмыкова²,
М.М. Тареева¹

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО) 143080, Россия, Московская обл., Одинцовский р-н, п ВНИИС-СОК, ул. Селекционная, д. 14
E-mail: romanov_valera@mail.ru;
tareeva-marina@rambler.ru

² ООО «Ифар» (Инновационные фармакологические разработки) Россия, Томск

Ключевые слова: полиплоидизация, культура *in vitro*, чеснок озимый, каллус, воздушные луковички, колхицин

Для цитирования: Романов В.С., Романова О.В., Герасимова Л.И., Середин Т.М., Шмыкова Н.А., Тареева М.М. Регенерация растений чеснока озимого *in vitro* после колхицинирования. Аграрная наука. 2020; 343 (11): 125–128.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-343-11-125-128>**Конфликт интересов отсутствует**

Valery S. Romanov¹,
Olga V. Romanova¹,
Lyubov I. Gerasimova¹,
Timofey M. Seredin¹,
Natalia A. Shmykova²,
Marina M. Tareeva¹

¹ FSBSI Federal Scientific Vegetable Center Selectionnaya str., 14, p. VNISSOK, Odintsovo district, Moscow region, 143072, Russia
E-mail: romanov_valera@mail.ru;
tareeva-marina@rambler.ru

² LLC «IPHAR» Tomsk, Russia

Key words: polyploidization, *in vitro* culture, winter garlic, callus, clove, colchicine

For citation: Valery S. Romanov, Olga V. Romanova, Lyubov I. Gerasimova, Timofey M. Seredin, Natalia A. Shmykova, Marina M. Tareeva. Regeneration of plant winter garlic *in vitro* after colchicine treatment. Agrarian Science. 2020; 343 (11): 125–128. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-343-11-125-128>**There is no conflict of interests**

Регенерация растений чеснока озимого *in vitro* после колхицинирования

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Генетическое разнообразие чеснока озимого полностью зависит от естественного отбора лучших и высокоурожайных клонов. В неблагоприятных абиотических факторах физиологические, а также биохимические свойства позволяют полиплоидным растениям обладать большей толерантностью и жизнеспособностью, чем диплоидные виды. Получение исходного материала на основе полиплоидии у чеснока озимого (*Allium sativum* L.) является одним из важных альтернативных подходов генетического совершенствования данной культуры.

Методика. Из воздушных луковичек чеснока были выращены через культуру *in vitro* растения. Предварительно воздушные луковички обрабатывались 0,1% раствором колхицина в экспозиции 1 час, 2 часа, 4 часа. Побеги и корни регенерировали путем культивирования эксплантов на 1/2 МС, с 3 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л индол-3-уксусной кислоты и культивировали на свету интенсивностью 5–8 тыс. ЛК и фотопериодом 18 часов. Обработка воздушных луковичек 0,1% раствором колхицина позволила получить растения чеснока озимого с помощью культуры *in vitro*.

Результаты. В конечном итоге нам не удалось получить цветущих форм у чеснока с помощью метода полиплоидизации. Но благодаря выращиванию чеснока озимого в условиях *in vitro*, появилась возможность ускорения селекционного процесса получением одного поколения в год «от воздушной луковички до воздушной луковички». При работе по получению полиплоидных форм следует использовать ряд сортов, так как их реакция на обработку колхицином неоднозначна, как и на условия выращивания и выживаемость. Наиболее отзывчивым для получения растений в культуре *in vitro* оказался сорт Юбилейный грибовский.

Regeneration of plant winter garlic *in vitro* after colchicine treatment

ABSTRACT

Relevance. The genetic diversity of winter garlic depends entirely on the natural selection of the best and highest-yielding clones. In unfavorable abiotic factors, physiological and biochemical properties allow polyploidy plants to have greater tolerance and viability than diploid species. Obtaining the source material based on polyploidy in winter garlic (*Allium sativum* L.) is one of the important alternative approaches to genetic improvement of this crop.

Methods. From air garlic bulbs, plants were grown through *in vitro* culture. Pre-air bulbs were treated with 0.1% colchicine solution for 1 hour, 2 hours, 4 hours. Shoots and roots were regenerated by cultivating explants for 1/2 MS, with 3 mg / l 6-BAP and 0.1 mg/l indole-3-acetic acid and cultured in light with an intensity of 5–8 ths. LC and a photoperiod of 18 hours. Treatment of air bulbs with 0.1% colchicine solution made it possible to obtain winter garlic plants using *in vitro* culture.

Results. In the end, we were not able to get flowering forms from garlic using the polyploidization method. But, thanks to the cultivation of winter garlic *in vitro*, it became possible to accelerate the selection process by obtaining one generation per year “from clove to clove”. When working on obtaining polyploidy forms, more than one variety should be used, since the reaction of varieties to colchicine treatment is ambiguous, as is their reaction to growing conditions and survival. The most responsive for obtaining plants *in vitro* culture was the Yubileyny Gribovsky variety.

Поступила: 23 ноября
После доработки: 25 ноября
Принята к публикации: 10 сентября

Received: 23 November
Revised: 25 November
Accepted: 10 september

Введение

Спонтанная полиплоидия является одним из основных факторов формообразования видов рода *Allium* L. Вегетативное размножение, как и различные формы апомиксиса, характерные для многих видов рода *Allium*, способствуют сохранению и распространению возникших полиплоидных форм. Также они обладают сравнительно низкими хромосомными числами, возделываются для использования вегетативных органов и т. д. [1]

Чеснок озимый (*Allium sativum* L.) — одна из важнейших овощных культур, относится к семейству *Alliaceae*. Диплоидное число чеснока озимого составляет ($2n = 16$), что упрощает осуществление цитологического контроля при получении новых селекционных форм. Регенерация *in vitro* чеснока озимого позволяет получить безвирусный посадочный материал [2], а также повысить эффективность микроразмножения растений с использованием апикальной меристемы зубков и воздушных луковичек [3]. Размножение семенами чеснока невозможно из-за генетического и физиологического сбоя при их формировании, и поэтому почти весь выращиваемый чеснок размножается посадкой отдельных зубков или воздушных луковичек в землю [4].

Генетическое разнообразие чеснока озимого полностью зависит от отбора лучших и высокоурожайных клонов. Несмотря на высокую степень генетической изменчивости, генетическое улучшение этой культуры серьезно затруднено из-за отсутствия в естественной популяции превосходящих клонов [5]. Основные характеристики чеснока основаны на вегетативных и репродуктивных параметрах. Это окраска луковицы, размер луковицы, число зубков в луковице и т. д. Семеноводство этой культуры требует биотехнологических подходов для генетического улучшения чеснока озимого.

Получение исходного материала на основе полиплоидии у чеснока озимого (*Allium sativum* L.) является одним из важных альтернативных подходов генетического совершенствования данной культуры.

Индукция полиплоидии является эффективным способом повышения фертильности и семенного размножения растений, путем улучшения морфологии, устойчивости к болезням, приспособляемости к окружающей среде и урожайности. Многие факторы влияют на индукцию полиплоидии растений, где индуктор удвоения хромосом и тип эксплантов *in vitro* считаются наиболее важными. Индуктор удвоения хромосом должен быть

не только эффективным, но и малотоксичным, а эксплант — надежным в размножении [6].

Из методов получения полиплоидов наиболее часто применяется метод обработки колхицином семян, реже применяют способы обработки колхицином соцветий с целью получения нередуцированных гамет. Помимо колхицина применяется еще ряд аналогично действующих веществ, но как показывает опыт наиболее действенным для растений остается колхицин [7].

В данных исследованиях проводилась возможность получения полиплоидных форм *Allium sativum* L. для создания цветущих растений и увеличения генетического разнообразия чеснока озимого.

Материал и методы исследования

Материалом для исследований служили воздушные луковички двух сортов чеснока озимого Юбилейный грибовский (*Allium longicuspis* Regel), Дубковский (*Allium sativum* L.).

Для получения полиплоидных форм чеснока озимого воздушные луковички заворачивали в капроновую ткань и помещали сначала в стеклянный сосуд с дезинфицирующим 0,01% раствором сулемы на 5 минут, затем многократно промывали в дистиллированной воде.

Далее растительный материал переносили в стеклянный сосуд с дезинфицирующим раствором коммерческого препарата «Белизна» с добавлением одной капли Твина-20 на 100 мл. Стерилизовали воздушные луковички в течение 10 минут, затем многократно промывали в стерильной дистиллированной воде до исчезновения пены.

Затем воздушные луковички помещали в 0,1% раствор колхицина в экспозиции 1 час, 2 часа, 4 часа. И снова многократно промывали в стерильной дистиллированной воде. В контроле воздушные луковички помещали в дистиллированную воду.

В ламинарном боксе воздушные луковички переносили в стерильные чашки Петри, отрезали у них донца под бинокуляр и помещали на поверхность агаризованной твердой питательной среды МС среды для каллусообразования, содержащей 0,05 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л 6-БАП, по десять донца на банку. В одном варианте было десять банок. Инкубировали донца в термостате при 25 °С в темноте.

Через 30 суток образовавшийся каллус для индукции побегообразования переносили на твердую среду 1/2

Таблица 1. Выход и число выживших растений у сортов чеснока озимого при обработке колхицином воздушных луковичек

Table 1. The yield and the number of surviving plants in varieties of winter garlic when treated with colchicine of air bulbs

Сорт	Вариант	Всего высаженных донца, шт.	Число каллусов, шт.	Число побегов без корней, шт. (%)	Число побегов с корнями, шт. (%)	Число выживших растений, шт. (%)	Число полиплоидов, шт. (%)
Юбилейный грибовский	контроль	100	50	30 (60,0)	20 (66,7)	20 (40,0)	-
	1 час	100	45	23 (51,1)	16 (69,6)	15 (33,3)	-
	2 часа	100	35	16 (45,7)	16 (100,0)	14 (40,0)	8 (22,8)
	4 часа	100	40	32 (80,0)	4 (12,5)	4 (10,0)	4 (10,01)
Дубковский	контроль	100	40	30 (75,0)	10 (33,3)	10 (10,0)	-
	1 час	100	20	15 (75,0)	4 (26,7)	4 (20,0)	-
	2 часа	100	25	13 (52,0)	2 (15,4)	2 (8,0)	2 (8,1)
	4 часа	100	15	10 (66,7)	3 (30,0)	3 (20,0)	1 (6,7)
HCP ₀₅							1,5

Рис. 1. Получение растений сорта чеснока озимого Юбилейный Грибовский после обработки колхицином воздушных луковичек: А – донце на питательной среде, Б – каллус, В – растеньице с корнями на питательной среде, Г – высаженное растение в торфо-почвенную смесь

Fig. 1. Obtaining plants of a variety of winter garlic Yubileiny Gribovsky after treatment with colchicine

МС, с 3 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л индол-3-уксусной кислоты и культивировали на свету интенсивностью 5–8 тыс. ЛК и фотопериодом 18 часов [7].

Хорошо развившиеся растеньица чеснока высаживали в горшочки со стерильной почвенной смесью, накрывали сверху перфорированным пластиковым стаканчиком и помещали в климатическую камеру при освещении 10–15 тыс. ЛК (в случае появления грибной инфекции почву и растения припудривали фундазолом) [8].

Оценка плоидности полученных растений проводилась по косвенным признакам: морфологии растения и размеру устьиц. Анализ устьиц проводился у растений в фазе 2–3 листьев на 1-ом-2-ом листе. Измеряли длину

30 устьиц. Полиплоидными считали растения, у которых не менее 50% измеренных устьиц — крупные, то есть длиной не менее 20 делений при измерении окуляромикрометром под микроскопом.

Об эффекте обработки в первый год судили по выходу полиплоидов, то есть растений, с крупными устьицами и по выживаемости (начальной, то есть выживаемости через 10–12 суток) после обработки и выживаемости к моменту анализа устьиц.

Результаты и их обсуждение

Реакция сортов чеснока озимого на обработку колхицином различна (табл. 1). Число сформировавшихся каллусов зависело как от генотипа сорта, так и от продолжительности обработки колхицином. Продолжительность обработки колхицином больше угнетало сорт Дубковский и сильнее всего это сказалось на корнеобразовании (от 2 до 4) по сравнению с образованием побегов из каллуса (от 10 до 15). У сорта Юбилейный Грибовский с увеличением времени обработки колхицином до 4 часов уменьшалось число побегов с корнями (с 16 до 4) по сравнению с побегами без корней (с 32 до 16) (рис. 1).

Число выживших растений также зависела от продолжительности обработки колхицином и реакции

сорта на условия выращивания. При 2-х часовой продолжительности обработки воздушных лукович чеснока число выживших растений было выше, чем при 4-х часовой обработке (40,0% от числа полученных каллусов).

Лучшие показатели по выходу полиплоидных растений чеснока в сравнении с контролем были у сорта Юбилейный Грибовский (22,8%).

У сорта Юбилейный Грибовский сформировалось больше растений, чем у сорта Дубковский. Однако в зависимости от продолжительности обработки колхицином растения чеснока озимого у сорта Юбилейный Грибовский за один год вегетации сформировали: при обработке колхицином воздушных луковичек 1 час —

Рис. 2. Растения чеснока озимого сорта Юбилейный Грибовский, сформировавшие луковицы и луковички в зависимости от времени обработки колхицином воздушных луковичек: А — 1 час (вызревшие луковицы и воздушные луковички); Б — 2 часа (вызревшие луковицы-однозубки), В — 4 часа (вызревшие луковицы и растение, продолжившее вегетацию по многолетнему типу)

вызревшие луковицы массой 30–35 г по 5–7 зубков, стрелку и воздушные луковички (8–12 шт) (одно поколение за год от воздушной луковички до воздушной луковички); при обработке колхицином воздушных луковичек 2 часа — вызревшие луковицы — однозубки 3–5 г; при обработке колхицином воздушных луковичек 4 часа — вызревшие луковицы массой 30–35 г по 6–7 зубков и два растения не сформировали луковицу и продолжали вегетацию по многолетнему типу. В контроле же были сформированы вызревшие луковицы массой 30–35 г по 6–7 зубков (рис. 2).

У выживших растений сорта Дубковский сформировались вызревшие луковицы массой 25–30 г по 5–6 зубков в независимости от времени обработки колхицином воздушных луковичек.

Уже по этим данным можно судить, что при обработке колхицином очень важна реакция сорта на условия выращивания, лабильность сорта, так как от этого (а не только от самой реакции на обработку колхицином) зависит выживаемость, а, следовательно, и выход полиплоидов. Очевидно, при работе по полиплоидизации следует брать не один, а несколько сортов в обработку для быстрого получения желаемого результата.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Джурманский Г.Т. Экспериментальное получение полиплоидов чеснока и лука-батун. Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. М. 1971. 20 с. [Jurmansky G. T. Experimental preparation of garlic and onion polyploids. Autoref. dis. ... cand. of agricultural Sciences. Moscow. 1971. 20 p. (In Russ.)]
2. Поляков А.В., Азопкова М.А., Лебедева Н.Н., Муравьева И.В. In vitro регенерация растений чеснока озимого (*Allium sativum* L.) из воздушных луковичек. Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2018;(4):115–124. [Polyakov A., Azopkova M., Lebedeva N., Murav'eva I. In Vitro Regeneration of Winter Garlic Plants (*Allium sativum* L.) from Air Bulbils. Bulletin of the Moscow State Regional University, Series: Natural Sciences. 2018;(4):115–124. (In Russ.)]
3. Sinha P., Kannan R., Ganesh D. Optimizing of Polyploidization by In-Vitro methods for genetic improvements of Garlic (*Allium sativum* L.). Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016;7(6):2004–2012.
4. Пивоваров В.Ф., Ершов И.И., Агафонов А.Ф. Луковые

Заключение

Так как чеснок озимый размножается вегетативным способом, очень ограничено его генетическое разнообразие. Метод полиплоидизации полезен для генетического улучшения чеснока озимого при развитии различных полиплоидных линий с желательными селекционными признаками.

Обработка воздушных луковичек сортов чеснока озимого 0,1% раствором колхицина позволила получить полиплоидные растения с помощью культуры *in vitro*. В конечном итоге нам не удалось получить цветущих форм у чеснока с помощью метода полиплоидизации. Но, благодаря, выращиванию чеснока озимого в условиях *in vitro*, появилась возможность ускорения селекционного процесса получением одного поколения в год «от воздушной луковички до воздушной луковички».

При работе по получению полиплоидных форм следует использовать ряд сортов, так как их реакция на обработку колхицином неоднозначна, как и на условия выращивания, а, следовательно, и выживаемость. Наиболее отзывчивым для получения растений в культуре *in vitro* оказался сорт Юбилейный грибовский. Однако выход полиплоидных растений сильно ограничен и составил 22,8%.

культуры. М. 2001. 499 с. [Pivovarov V.F., Yershov I.I., Agafonov A.F. Onion cultures. Moscow. 2001. 499 p. (In Russ.)]

5. Van Damme E.J.M., Smeets K., Torreken S., Van Leuven F., Peumans W.J. Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species. Eur. J. Biochem. 1992;(209):751–757.

6. Dixit V., Chaudhary B.R. Colchicine-induced tetraploidy in garlic (*Allium sativum* L.) and its effect on allicin concentration. Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 2014;89(5):585–591.

7. Cheng Z.-H., Zhou X.-J., Khan M.A., Su L., Meng H.-W. In vitro induction of tetraploid garlic with trifluralin. Genetics and Molecular Research. 2012;11 (3):2620–2628.

8. Шмыкова Н.А. Разработка системы биотехнологических методов, направленных на ускорение селекционного процесса овощных культур. Автореф. дис. ... докт. с.-х. наук. М. 2006. 47 с. [Shmykova N.A. Development of a system of biotechnological methods aimed at accelerating the breeding process of vegetable crops. Autoref. dis. ... doctor of agricultural Sciences. M. 2006. 47 p. (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ:

Валерий Станиславович Романов, кандидат с.-х. наук, с.н.с., <https://orcid.org/0000-0002-3287-1914>
Ольга Витальевна Романова, кандидат с.-х. наук, м.н.с., <https://orcid.org/0000-0002-6513-1541>
Любовь Ивановна Герасимова, кандидат с.-х. наук, с.н.с.
Тимофей Михайлович Середин, кандидат с.-х. наук, с.н.с.
Наталья Анатольевна Шмыкова, доктор с.-х. наук, начальник отдела ОФР
Марина Михайловна Тареева, кандидат с.-х. наук, с.н.с., <https://orcid.org/0000-0001-5817-0860>

ABOUT THE AUTHORS:

Valery S. Romanov, Cand. Sci. (Agriculture), Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-3287-1914>
Olga V. Romanova, Cand. Sci. (Agriculture), Junior Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-6513-1541>
Lyubov I. Gerasimova, Cand. Sci. (Agriculture), Senior Researcher
Timofey M. Seredin, Cand. Sci. (Agriculture), Senior Researcher
Natalia A. Shmykova, Doc. Sci. (Agriculture), director of OFR Department
Marina M. Tareeva, Cand. Sci. (Agriculture), Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-5817-0860>