

УДК 001.4:632.3

**ЭМБРИОКУЛЬТУРА
В СЕЛЕКЦИИ ВИШНИ
И ЧЕРЕШНИ**

Бунцевич Леонид Леонтьевич
канд. биол. наук
зав. лабораторией вирусологии

Захарченко Валерия Викторовна
мл. научный сотрудник

Беседина Екатерина Николаевна
мл. научный сотрудник

Костюк Марина Александровна
мл. научный сотрудник

*Государственное научное учреждение
Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт
садоводства и виноградарства
ФАНУ России, Краснодар, Россия*

Метод эмбриокультуры находит все более широкое применение в межвидовой гибридизации плодовых растений. В целях его совершенствования исследуется гормональная регуляция роста и развития зародышей *in vitro*, определяется оптимальный возраст зародышей, вводимых в культуру. Основная цель представленной работы – получить жизнеспособные растения из щуплых семян и невсхожих зародышей гибридов черешни и вишни в процессе их культивирования *in vitro*, выделить эффективные регуляторы роста, установить оптимальные сроки ввода зародышей в культуру. Представлены результаты исследований по культивированию зародышей черешни и вишни *in vitro* 16 комбинаций скрещивания. Получены регенеранты гибридных зародышей вишни и черешни в культуре *in vitro* от 16-ти комбинаций скрещиваний. Выделена лучшая для культуры зародышей черешни и вишни модификация среды Мурасиге-Скуга

UDC 001.4:632.3

**THE EMBRYOS TECHNIQUES
IN THE BREEDING OF CHERRIES
AND SWEET CHERRIES**

Buntsevich Leonid
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Virology

Zaharchenko Valerya
Junior Research Associate

Besedina Catherine
Junior Research Associate

Kostyuk Marina
Junior Research Associate

*State Scientific Organization North
Caucasian Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture of FASO
of Russia, Krasnodar, Russia*

The method of embryo culture has more and more wide application in the interspecific hybridization of fruit plants. For its improvement the hormonal regulation of growth and development of embryos *in vitro* is researched and the optimal age of embryos injected into culture is defined. The main objective of the presented work is to receive the viable plants from puny seeds and not sprout embryos of hybrids of sweet cherry and cherry in the course of their cultivation *in vitro* and to allocate the effective growth regulators and to establish the optimal terms of embryos input in the culture. The results of research on cultivation *in vitro* of sweet cherry and cherry of 16 combinations of crossing are presented. The regenerants of hybrid embryos of cherry and sweet cherry *in vitro* culture from 16 combinations of crossings are received. For embryos culture of sweet cherry and cherry the best modification of Murashige-Skoog environment with 79 % level of embryos

с уровнем регенерации эмбрионов 79%. Выявлена наиболее эффективная концентрация гибберелловой кислоты в среде при культивировании зародышей вишни и черешни: 10 мг гибберелловой кислоты на 1 л среды Мурасиге-Скуга, при этом размер зародышей должен быть максимальным.

Ключевые слова: СЕЛЕКЦИЯ ВИШНИ И ЧЕРЕШНИ, ЭМБРИОНЫ, ГИБРИДЫ, БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ГИББЕРЕЛИН

regeneration is allocated. The most effective concentration of gibberellic acid in the environment for cultivation of cherry and sweet cherry is revealed. That is 10 mg of gibberellic acid per 1 liter of the Murashige-Skoog environment, for all that the embryo size should be maximized.

Key words: BREEDING OF CHERRY AND SWEET CHERRY, EMBRYOS, HYBRIDS, BIOTECHNOLOGICAL METHODS, NUTRIENT MEDIUMS, GIBBERELIN

Введение. В настоящее время перед селекционерами садовых растений стоят задачи получения новых сортов, обладающих таким ценным свойством, как раннеспелость. У некоторых плодовых культур эту задачу затруднительно решить традиционными методами. Так, при селекции вишни и черешни признак раннеспелости рецессивен и не передаётся, если материнское растение является среднеспелым. Если же плоды материнского растения созревают в ранний срок, то зародыши гибридных семян получают нежизнеспособными в результате постгамной несовместимости. Доращивание таких нежизнеспособных зародышей *in vitro* позволяет сохранить ценный гибрид [1].

При выведении сортов, обладающих комплексом биологических, хозяйственно-полезных признаков, часто возникает потребность заимствования необходимых свойств от других видов, то есть использование отдалённой гибридизации [2]. При отдалённой гибридизации после оплодотворения зачастую возникает постгамная несовместимость, вследствие чего образуются шуплые невсхожие семена. В этом случае для выращивания зародышей во взрослые жизнеспособные растения применяется эмбриокультура [3]. Культура изолированных зародышей применяется не только для преодоления постгамной несовместимости, но также с целью микро-размножения ценных гибридов. Техника клонирования незрелых зароды-

шей позволяет размножать ценные генотипы растений на ранних стадиях жизненного цикла. Факторами, определяющими эффективность эмбриокультуры, являются состав, консистенция и рН питательной среды, присутствие в ней и концентрация ростовых веществ, интенсивность освещения, фотопериод, температура и влажность. Зародыши разных пород культивируются на питательных средах Уайта, Нитча, Гамборга (В5), Мурасиге и Скуга (МС), WPM, DKW, Гресшофа и Доу (ГД) и др. Среда МС чаще всего используется в половинной концентрации макро- и микроэлементов и является базовой питательной средой для многих видов растений [4, 5].

Метод эмбриокультуры имеет широкое применение в межвидовой гибридизации плодовых растений. В целях его совершенствования исследуется гормональная регуляция роста и развития зародышей *in vitro*, оптимальный возраст зародышей, вводимых в культуру. По мнению Т.В. Плаксиной, для сохранения и размножения наиболее ценных гибридов вишни следует вводить 30-дневные зародыши в культуру *in vitro*, используя питательную среду МС с БАП 2 мкМ (достигается получение от 16,7 до 40 % нормально развивающихся зародышей) [6]. Лучшие результаты дает культивирование 45-дневных зародышей на среде с БАП 2 мкМ (50-90 %).

Основная цель работы – получить жизнеспособные растения из щуплых семян и невсхожих зародышей гибридов черешни и вишни в процессе их культивирования *in vitro*, выделить эффективные регуляторы роста, установить оптимальные сроки ввода зародышей в культуру.

Объекты и методы исследований. Работа выполнена в центре размножения плодовых, ягодных культур и винограда ГНУ СКЗНИИСиВ. За основу принята методика культивирования изолированных зародышей Р.Г. Бутенко (1999). В исследованиях использована среда Мурасиге и Скуга. Объекты исследований – зародыши гибридов от внутривидовых и межвидовых скрещиваний, полученные после опыления черешни и вишни ранних сортов.

Завязавшиеся плоды очищали от мякоти, косточки стратифицировали в холодильнике в течение месяца, после чего отмывали в крепком растворе $KMnO_4$, затем расщелкивали, и семена вместе с семенными оболочками промывали в проточной воде один час, стерилизовали 0,1%-ным раствором йодида ртути 8-10 мин, затем промывали в стерильном дистилляте и извлекали зародыши. Зародыши вводили в культуру *in vitro* в различные сроки после опыления. Среды готовили по протоколу Мурасиге-Скуга (1962), состав компонентов среды и концентрация ростовых веществ варьировались. Культивировали экспланты на свету при 8-часовом освещении и температуре $+25^{\circ}C$. При таких условиях через полторы-две недели регенерировали проростки, имеющие корешок и пару настоящих листьев.

Обсуждение результатов. В процессе работы введены нами в культуру *in vitro* и размножены зародыши экспериментальных гибридов черешни и вишни (рис. 1): Чудо вишня x Рубиновая, Чудо вишня x Краснодарская сладкая, Кавказская x Франц Иосиф, Кавказская x Чудо вишня, Краснодарская ранняя x Мелитопольская ранняя, Молодежная x Чудо вишня, Чудо-вишня x Романтик, Норд стар x Gudian, Молодёжная x *Cerasus Iannesiana*, Молодёжная x *Cerasus yedoensis*, Молодёжная x *Kuroloensis*, Молодёжная x *Nali-talivetta*, Ранняя Марки x Рубиновая, (гибридизация выполнена селекционерами СКЗНИИСиВ канд. с.-х. наук Е.М. Алехиной, канд. с.-х. наук С.В. Говорущенко и канд. биол. наук А.П. Кузнецовой).

Выделена лучшая для культуры эмбрионов черешни модификация среды Мурасиге-Скуга, среди трёх основных испытанных вариантов, показавшая максимальный уровень (79%) успешного развития зародышей. Среды готовились с половинным содержанием солей, с добавлением витаминов B_1 , B_6 , C, PP и мезоинозита по В.А. Высоцкому [3]. Содержание стимуляторов роста составило: 6-БАП – 1мг/л, ИМК – 0,1 мг/л. Уровень гибберелловой кислоты варьировался (табл. 1).



а б в

Рис. 1. Микрорастения вишни и черешни, выращенные из зародышей гибридных семян

а – гибриды Чудо вишня x Рубиновая, б – Краснодарская ранняя x Мелитопольская ранняя, в – Кавказская x Чудо вишня



а б в г

Рис. 2. Адаптированные растения

а – Ранняя Марки x Рубиновая, б – Чудо вишня x Рубиновая, в – Краснодарская ранняя x Мелитопольская ранняя, г – Кавказская x Чудо вишня

Гибридные растения, регенерированные *in vitro* из зародышей, адаптированы к условиям *in vivo*, выращены в сосудах с субстратом (рис. 2), после чего перенесены в школку. Установлено, что на индукцию роста зародышей *in vitro* положительное воздействие оказывает гибберелловая кислота (ГК). В концентрации 10 мг/л (среда №2) действие ГК проявляется сильнее, чем в концентрации 1мг/л (среда №3). На среде без ГК (среда №1) прорастание зародышей самое слабое (см. табл. 1). Дисперсионный анализ полученных результатов показал, что различия в действии разных вариантов сред (№ 1, 2, 3) достоверны на 5% уровне значимости (табл. 2).

Таблица 1 – Регенерация гибридных зародышей черешни и вишни на средах различного состава (по Мурасиге-Скугу)

Гибрид (сорт)	Проросло зародышей на средах		
	1 (контроль, МС без ГК), шт. - %	2 (МС + ГК 10 мг/л), шт. - %	3 (МС + ГК 1 мг/л), шт. - %
Чудо-вишня х Романтик	5-25	20-100	10-50
Чудо вишня х Рубиновая	1-5	16-80	8-40
Чудо вишня х Краснодарская сладкая	4-2	18-90	10-50
Кавказская х Франц Иосиф	8-40	10-50	12-60
Кавказская х Чудо вишня	3-15	12-60	15-75
Краснодарская ранняя х Мелитопольская ранняя	0-0	5-25	7-35
Молодёжная х Lannesiana	7-35	20-100	13 ^x - 65
Ранняя Марки х Рубиновая	10-50	19-95	11-55
Молодёжная х Cerasus yedoensis	1-5	17-85	9-45
Молодежная х Чудо вишня	4-20	20-100	12-60
В среднем (%)	20	79	53

Таблица 2 – Дисперсионный анализ влияния фактора «состав среды» на индукцию органогенеза гибридных зародышей черешни и вишни

Изменчивость	Степень свободы	Средний квадрат	F-отношение	Дисперсия
Между вариантами сред	2	326,53	23,06*	31,20
Остаточная	3	14,16	-	14,16

Примечание. Знаком "*" отмечены значения критерия Фишера, превосходящие стандартное для 5 %-ного уровня значимости

Заключение. Получены регенеранты гибридных зародышей вишни и черешни в культуре *in vitro* от 16-ти комбинаций скрещиваний. Выделена лучшая для культуры зародышей черешни и вишни модификация среды Мурасиге-Скуга с уровнем регенерации эмбрионов 79%, содержащая половинный состав солей, с добавлением витаминов В₁ В₆, С, РР, стимуляторов роста б-БАП, ГК, ИМК и мезоинозита.

Выявлена наиболее эффективная концентрация гибберелловой кислоты в среде при культивировании зародышей вишни и черешни: 10 мг

ГК на 1 л среды М-С. Лучшая фенофаза для извлечения зародышей черешни для сортов сверхранних сроков созревания – незрелые ягоды с розовой окраской; для сортов среднеранних сроков созревания – полная зрелость ягод. При этом размер зародышей должен быть максимальным.

Литература

1. Джигадло, Е.Н. Совершенствование методов селекции, создание сортов вишни и черешни, их подвоев с экологической адаптацией к условиям Центрального региона России / Е.Н. Джигадло.– Орел: ВНИИСПК.– 2009.– 268 с.
<http://www.vniispk.ru/book.php?article=1&product=1&key=42>
2. Доля Ю.А. Новые сорта вишни для создания продуктивных насаждений Краснодарского края /Ю.А. Доля // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс].– Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2013. – № 21(3).– С. 54-61.– Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/13/03/06.pdf>.
3. Кузнецова, А.П. Методы биотехнологии при создании устойчивых к коккомикозу форм рода *Strasus Mill* / А.П. Кузнецова, М.С. Ленивцева, А.А. Воронов // Агро XXI. – 2010. – № 10-12. – С. 15-17.
4. Высоккий, В.А. Использование методов культуры изолированных тканей и органов для оздоровления и ускоренного размножения плодовых и ягодных растений // Селекция плодовых и ягодных культур: сб. науч. тр. / ВАСХНИЛ Сиб. отд-ние НИИСС.– Новосибирск, 1989.– С. 132-138.
5. Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S., Marraffa S.B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis // Hort. Rev. – 1980. – 2. – P. 268-310.
6. Плаксина, Т.В. Особенности размножения алтайских генотипов вишни и микровишни с использованием методов биотехнологии: автореф. ... канд. с.-х. наук: 60.01.07. – Барнаул, 2007. – 18 с.

References

1. Dzhigadlo, E.N. Sovershenstvovanie metodov selektsii, sozdanie sortov vish-ni i chereshni, ih podvov s ekologicheskoy adaptatsiey k usloviyam Tsentral'nogo re-giona Ros-sii / E.N. Dzhigadlo.– Orel: VNIISPК.– 2009.– 268 s.
<http://www.vniispk.ru/book.php?article=1&product=1&key=42>
2. Dolya Yu.A. Novye sorta vishni dlya sozdaniya produktivnyh nasazhdeniy Krasnodarskogo kraya /Yu.A. Dolya // Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii [Elektronnyj resurs].– Krasnodar: SKZNIISiV, 2013. – № 21(3).– S. 54-61.– Rezhim dos-tupa: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/13/03/06.pdf>.
3. Kuznetsova, A.P. Metody biotekhnologii pri sozdanii ustoychivyh k kokkomi-kozu form roda *Strasus Mill* / A.P. Kuznetsova, M.S. Lenivtseva, A.A. Voronov // Agro XXI. – 2010. – № 10-12. – S. 15-17.
4. Vysotskiy, V.A. Ispol'zovanie metodov kul'tury izolirovannyh tkaney i organov dlya ozdorovleniya i uskorenno razmnozheniya plodovyh i yagodnyh rasteniy // Seleksiya plodovyh i yagodnyh kul'tur: sb. nauch. tr. / VASHNIL Sib. otd-nie NIISS.– Novosibirsk, 1989.– S. 132-138.
5. Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S., Marraffa S.B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis // Hort. Rev. – 1980. – 2. – P. 268-310.
6. Plaksina, T.V. Osobennosti razmnozheniya altayskiy genotipov vishni i mikrovishni s ispol'zovaniem metodov biotekhnologii: avtoref. ... kand. s.-h. nauk: 60.01.07. – Barnaul, 2007. – 18 s.