

УДК 634.23:631.53:581.6

Н. Н. Коваленко, к.с.-х.н.

Н. В. Поливара, м.н.с.

ГНУ Крымская опытно-селекционная станция СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии, Россия, Краснодарский край,
г. Крымск, *kross67@mail.ru*

ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНОВ ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ РОДА *CERASUS MILL.* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Аннотация

Проведены исследования по отработке методики культивирования зародышей некоторых отдаленных гибридов рода *Cerasus Mill.* в условиях *in vitro*. Выявлены оптимальные сроки ввода их в культуру. Определены параметры питательных сред с биологически активными добавками, положительно влияющие на рост и развитие микрорастений. Предложено совмещение культуры зародышей с клональным микроразмножением.

Ключевые слова: питательная среда, фитогормоны, зародыши, гибриды, клонирование

UDC 634.23:631.53:581.6

N. N. Kovalenko, candidate of agricultural sciences

N. V. Polivara, junior researcher

Krymsk Experimental Breeding Station of North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture of the RAAS, Russia, Krymsk, kross67@mail.ru

RECEIVING CLONES OF REMOTE HYBRIDS OF GENUS *CERASUS MILL.* IN CULTURE *IN VITRO*

Abstract

Researches on the working off of a technique of cultivation of germs of some remote hybrids of genus *Cerasus Mill.* have been conducted in the conditions of *in vitro*. Optimum terms of their input in culture have been revealed. Parameters of nutrient mediums with the biologically active supplements positively influencing on the growth and development of microplants have been determined. Combination of culture of germs with clonal micropropagation is offered.

Key words: nutrient medium, phytohormones, germs, hybrids, cloning

Введение

Практика садоводства выдвигает перед селекционерами задачи по выведению всё новых сортов и подвоев в сжатые сроки. Ускорение процесса их получения становится возможным с применением биотехнологических методов [8]. Один из таких методов – метод искусственной культуры зародышей. Он позволяет получить сеянцы на искусственных питательных средах из тех гибридных семян, которые в обычных условиях выращивания не дают полноценных всходов. Такой прием получения сеянцев позволяет значительно повысить процент жизнеспособных гибридов путем дорастивания нежизнеспособных зародышей *in vitro*. Селекционерами уже получены сеянцы второго поколения от ряда стерильных и слабофертильных гибридов сливы, вишни обыкновенной, вишни войлочной, яблони, айвы и груши [4...7].

При создании принципиально новых высокоадаптивных сортов плодовых культур используется такой метод как отдаленная гибридизация [2, 4, 5]. Однако при этом зачастую наблюдается постгамная несовместимость [2, 3], в результате которой становится практически невозможным получение жизнеспособных зародышей. И в этом случае решение проблем возможно с применением эмбриокультуры *in vitro*.

Новизна исследований

Определяется отсутствием методики получения селекционного материала сортов и подвоев черешни с участием видов и форм рода *Cerasus*, позволяющей преодолеть полную само- и перекрестную несовместимость при межвидовых и межродовых скрещиваниях, а также повысить выход гибридных регенерантов.

Условия, объекты и методы исследования

Работа проведена в лаборатории оздоровления и эксплантации растений ГНУ Крымской опытно-селекционной станции КОСС СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии в 2012...2014 гг.

В качестве исходного материала использовались плоды (завязь) отдаленных гибридов видов рода *Cerasus* Mill.: *C. serrulata* × 42-2-16 (гибрид черешни), *C. sachalinensis* × *C. avium*. Они были получены из отдела генетических ресурсов и селекции плодовых и ягодных культур КОСС.

В исследованиях руководствовались методическими рекомендациями А.И. Здруйковской-Рихтер [3].

Зародыши вычленили из плодов в асептических условиях ламинарных боксов (марки ВЛ-12). Их стерилизацию проводили по отработанной нами схеме. Она заключается в следующем: отмывка раствором моющего средства → 1,5 часовая промывка проточной водой → стерилизация в течение 5 минут 0,1 % раствором стерилизующего вещества → 5-ти кратная промывка стерильной водой с экспозицией по 5 минут.

Обработанные зародыши высаживали в стерильные пробирки размером 21,0...140 мм с питательной средой. В качестве последней использовали питательные среды Мурасиге и Скуга (1962) (M-S), *Prunus* (Pr.), и Woody plant medium (WPM). В каждом опыте было 3 повторности по 20 зародышей.

Культивирование зародышей *in vitro* происходило при освещении 2,5 тыс. люкс с 16 часовым фотопериодом при постоянной температуре равной +24 °С на световых стеллажах (рисунок 1).



Рисунок 1 – Общий вид стеллажей с зародышами, введенными в культуру *in vitro*

Результаты исследования

Одним из важных этапов работы с культурой зародышей плодовых *in vitro* является определение оптимальных сроков их вычленения из плодов. При этом необходимо учитывать ряд факторов: степень дифференциации зародыша, различие энергии развития в искусственных условиях, обусловленных генотипом растения, с которого он был взят. Это в полной мере относится и к видам рода *Cerasus*. В связи с этим нами были поставлены опыты по уточнению срока ввода в культуру зародышей гибридов.

В наших опытах выделение зародышей из плодов и ввод их в культуру *in vitro* проводили в 4 срока: на 19, 23, 28, 32 день с момента опыления (таблица 1). Анализ результатов исследований показал, что наиболее оптимальным сроком изоляции зародышей отдаленных гибридов черешни является 28 и 32 день после фазы опыления, поскольку количество проросших зародышей, в процентном соотношении выше, (от 5 до 35 %), чем в первых двух. Причем, для гибрида *C. serrulata* × 42-2-16 наиболее оптимальным является 32 день, а для *C. sachalinensis* × *C. avium* – 28 день после оплодотворения.

Таблица 1 – Влияние сроков изоляции зародышей отдаленных гибридов на их приживаемость в условиях *in vitro* на среде М-5

Гибрид	День изоляции			
	19	23	28	32
	Количество проросших зародышей в зависимости от сроков изоляции, %			
<i>C. serrulata</i> × 42-2-16	0	0	5	35
<i>C. sachalinensis</i> × <i>C. avium</i>	0	0	35	15

Успех дальнейшего культивирования зародышей *in vitro* зависит и от состава питательных сред, на которых будет развиваться микрорастение на всех этапах культивирования [3, 7]. В связи с этим была поставлена задача оптимизации их состава в соответствии с конкретными гибридами и этапами их культивирования. Для её решения при вводе в культуру *in vitro* изолированных зародышей отдаленных гибридов черешни было использовано несколько питательных сред на основе солей М-5 и Prunus с различными биологически активными добавками, в том числе, витаминами и фитогормонами. Из их числа в итоге было выделено 4 среды: М₃, М₄, М₅ и Prunus, которые они давали положительный эффект для развития микрорастений (таблица 2).

Таблица 2 – Состав питательных сред для культивирования отдаленных гибридов черешни в *in vitro*

Компоненты п/среды	Модифицированные питательные среды М-5			Prunus
	М ₃	М ₄	М ₅	
Основной состав, мг/л	по прописи	по прописи	по прописи	по прописи
Витамины, мг/л	В ₁ , В ₆ – 0,5; РР – 2,0; С – 1,0; мезоинозит – 100,0	В ₁ , В ₆ ; РР – 0,5; С – 1,0;	В ₁ – 0,1; мезоинозит – 100,0 -	В ₁ , В ₆ ; РР – 0,5; С – 2,0; -
Аминокислоты, мг/л	глицин – 2,0	-	глутамин – 2,0	-
Фитогормоны, мг/л	кинетин – 0,2; ГК – 0,5; α-НУК – 0,5	6-БАП – 0,8 - -	6-БАП – 0,2 - -	6-БАП – 0,5 - -
Сахароза, г/л	20,0	20,0	10,0	30,0
рН	5,6÷5,7	5,6÷5,7	5,6÷5,7	5,7

При сроке изоляции зародышей на 32 день с момента опыления их прорастание отмечалось нами на всех опытных средах (таблица 3).

Таблица 3 – Количество проросших зародышей отдаленных гибридов черешни в зависимости от питательной среды

Гибрид	Питательная среда			
	M ₃	M ₄	M ₅	Prunus
	Количество проросших зародышей, %			
<i>C. serrulata</i> × 42-2-16	30	5	-	5
<i>C. sachalinensis</i> × <i>C. avium</i>	10	15	20	5

Но все же в сравнении с другими средами наиболее оптимальной питательной средой для зародышей гибрида *C. sachalinensis* × *C. avium* оказалась модифицированная среда M₅ (20 % проросших зародышей), а для *C. serrulata* × 42-2-16 – была M₃ (30 %).

На этих выделенных нами средах (M₃, M₅) шел активный рост и развитие гибридных зародышей.

Для ускорения селекционного процесса дальнейшее выращивание гибридов черешни мы предлагаем совмещать с микроклональным размножением. Это позволит, во-первых, увеличить число растений из единственного сеянца, во-вторых, даст возможность предотвратить его утерю в ходе различных этапов культивирования как *in vitro*, так и *in vivo*, и, в-третьих, получить его идентичные элитные копии для оценки в ходе производственного испытания. Все это существенно сокращает весь селекционный процесс по времени, как минимум на два года.

В наших исследованиях микроклональное размножение сеянцев проводили на питательной среде Woody plant medium (WPM), с различными модификациями по фитогормонам и ростовым веществам. Выбор этой питательной среды не случаен: она была подобрана для клонального микроразмножения гибридов черешни в лаборатории ранее [7]. В ходе реконгносцировочных опытов в 2012...2013 годах, нами была подобрана оптимальная концентрация фитогормонов в этой среде (таблица 4).

К третьему пассажу коэффициент размножения на ней, в зависимости от происхождения гибрида, составил: В. сахалинская × Черешня – 5,2; *C. serrulata* × 42-2-16 – 3,0.

Таблица 4 – Состав питательной среды для размножения гибридных сеянцев в культуре *in vitro*

Компоненты п/среды	Woody plant medium (WPM)
Основной состав, мг/л	по прописи
Витамины, мг/л	B ₁ , B ₆ – 0,4; PP – 0,2; C – 1,0; мезоинозит – 100,0
Фитогормоны, мг/л	ИМК – 0,03; ГК – 0,1; 6-БАП – 0,5
Сахароза, гр/л	30
pH	5,6÷5,8

При клональном микроразмножении растения-регенеранты были не высокими и в среднем не превышали 1,0 см в высоту. Укоренять по нашим данным лучше единичные побеги высотой от 1,5 см и выше, [7]. Поэтому необходим еще и этап удлинения побегов. В связи с этим для элонгации изучаемых гибридов были испытаны три питательные среды на основе солей WPM и M-S (таблица 5).

Таблица 5 – Состав питательных сред для элонгации микрорастений в культуре *in vitro*

Компоненты питательной среды	WPM B	WPM B1	M-S B
Основной состав, мг/л	по прописи	по прописи	по прописи
Витамины, мг/л	B ₁ – 0,2; B ₆ ; PP – 0,5; C – 1,0; мезоинозит – 100,0	B ₁ – 0,1; B ₆ – 0,5; PP – 0,4; C – 1,0 мезоинозит – 100,0	B ₁ – 0,1; B ₆ – 0,5; PP – 0,4; C – 1,0 мезоинозит – 100,0
Фитогормоны, мг/л	6-БАП – 0,2; ГК – 0,8	6-БАП – 0,5; ГК – 0,5	6-БАП – 0,2; ГК – 0,8
Сахароза, гр/л	30,0	30,0	30,0
pH	5,6÷5,8	5,6÷5,8	5,6÷5,8

Как показали наблюдения за ростом и развитием микрорастений, наиболее оптимальной из них оказалась питательная среда M-SB на основе солей Мурасиге и Скуга, где содержание ростовых веществ составляло: 6-БАП – 0,2 мг/л и ГК – 0,8 мг/л. При этом высота растения, в зависимости от гибрида, колебалась в следующих пределах: В. сахалинская × Черешня – от 1,5 до 4 см, а *C. serrulata* × 42-2-16 от 1,5 до 3 см (рисунок 2).

Рисунок 2 – Этап элонгации гибрида *C. serrulata* × *C. avium* в условиях *in vitro* на питательной среде M-SB

Укоренение микропобегов *in vitro* гибридов черешни, достигших ≈ 1,5 см в высоту, доходило до 100 % прижившихся из числа высаженных. Стопроцентное укоренение микропобегов было получено на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга представленной в таблице 6. Её основной особенностью в отличие от стандарта является отсутствие NH₄NO₃, мезоинозита и уменьшенное количество сахарозы до 20 г/л.

Таблица 6 – Состав питательной среды Мурасиге и Скуга для укоренения микрочеренков гибридов черешни в культуре *in vitro*

Компоненты питательной среды	Питательная среда
Основной состав, мг/л	по прописи без NH ₄ NO ₃
Витамины, мг/л	B ₁ – 0,2; C – 0,5; B ₆ – 0,5; PP – 0,5;
Фитогормоны, мг/л	6-БАП – 0,001; ГК – 0,1 мг/л; β-ИУК – 0,2
Углеводы, г/л	Сахароза – 20,0
Агар, г/л	7,0
pH	5,6÷5,8

В лабораторных условиях появление корней у микрочеренков гибридов черешни отмечали через 13...15 дней после пересадки на эту среду (рисунок 3).



Рисунок 3 – Ризогенез микропобегов *C. serrulata* × *C. avium* *in vitro*

Выводы

1. Оптимальным сроком изоляции зародышей с целью последующего введения их в культуру *in vitro* для изученных отдаленных гибридов черешни является период с 28 по 32 день после фазы оплодотворения.

2. Для культивирования зародышей гибрида *C. sachalinensis* × *C. avium* оптимальной является питательная среда Мурасиге и Скуга с содержанием В₁ – 0,1 мг/л; мезоинозит – 100 мг/л; глутамин – 2,0 мг/л; 6-БАП – 0,2 мг/л; сахараза – 10 г/л.

3. У зародышей гибрида *C. serrulata* × 42-2-16 наибольший процент прорастания достигнут на питательной среде М-S с содержанием В₁; В₆ – 0,5 мг/л; РР – 2,0 мг/л; С – 1,0 мг/л; мезоинозит – 100 мг/л; глицин – 2,0 мг/л; кинетин – 0,2 мг/л; ГК – 0,5 мг/л; λ-НУК – 0,5 мг/л; сахараза – 20,0 г/л.

4. Для клонального микроразмножения зародышей изучаемых сеянцев черешни в условиях *in vitro* оптимальной является питательная среда WPM с содержанием В₁; В₆ – 0,4 мг/л; РР – 2,0 мг/л; С – 1,0 мг/л; мезоинозит – 100 мг/л; ИМК – 0,03 мг/л; ГК – 0,1 мг/л; 6-БАП – 0,5 мг/л; сахараза – 30,0 г/л.

5. Для элонгации микрорастений в культуре *in vitro* целесообразно использовать питательную среду Мурасиге и Скуга с содержанием В₁ – 0,1 мг/л; В₆ – 0,5 мг/л; РР – 0,4 мг/л; С – 1,0 мг/л; мезоинозит – 100 мг/л; 6-БАП – 0,2 мг/л; ГК – 0,8 мг/л; сахараза – 30,0 г/л.

6. Для успешного укоренения микропобегов изучаемых гибридов необходимо исключить NH₄NO₃ и мезоинозит из питательной среды М-S и дополнить витаминами: В₁ – 0,2 мг/л; В₆; РР; С – 0,5 мг/л; фитогормонами: 6-БАП – 0,001 мг/л; ГК – 0,1 мг/л; β-ИУК – 0,2 мг/л.

Литература

1. Еремин, Г.В. Результаты и актуальные направления в селекции клоновых подвоев для черешни / Г.В. Еремин, В.Н. Подорожный // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ / ВСТИСП. – М., 2011. – Т.28, ч.1 – С. 174-180.

2. Захарченко, В.В. Использование культуры изолированных зародышей черешни в селекции на раннеспелость / В.В. Захарченко, Л.А. Бунцевич // Генет.

ресурсы культур. растений: медунар. науч.-практ. конф.; 13-16 ноября: тез. докл. – СПб., 2001. – С.287-288.

3. Здруйковская-Рихтер, А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*: метод. рекомендации / А.И. Здруйковская-Рихтер. – М.: ВАСХНИЛ, ГНБС, 1962. С.– 62.

4. Кравцов, П.В. Опыт применения культуры изолированных зародышей для преодоления стерильности отдаленных гибридов плодовых растений / П.В. Кравцов, В.Г. Касьянова // Тр. ЦГЛ им. И.В. Мичурина. – Мичуринск, 1969. – Т.10 – С. 236-244.

5. Курсаков, Г.А. Применение искусственной культуры зародышей *in vitro* при отдаленных скрещиваниях косточковых культур / Г.А. Курсаков // Там же. – 1974. – Т.15. – С. 11-22.

6. Кухарчик, Н.В. Культура зародышей *in vitro* в селекции *Cerasus* на раннеспелость / Н.В. Кухарчик // Плодоводство / Ин-т плодоводства НАН Беларуси. – Самохваловичи, 1994. – Т.9. – ч.1. – С. 56-63.

7. Медведева, Н.И. Особенности клонального микроразмножения клоновых подвоев косточковых культур / Н.И. Медведева, Н.И. Поливара, В.Н. Подорожный // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ / ВСТИСП. –М., 2011. –Т. 26. – 315-321 с.

8. Подорожный, В.Н. Создание и ускоренное внедрение в мировое производство клоновых подвоев для черешни и вишни с использованием биотехнологических методов / В.Н. Подорожный // Вклад ВОГиС в решении проблем инновационного развития России: материалы науч. – практ. конф. Кубан. отд-ния ВОГиС; 16 ноября 2011 г. – Краснодар, 2012. – С.169.

9. Щеглов, Н.И. Культура зародышей *in vitro* как метод селекции плодовых растений / Н.И. Щеглов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Краснодар: КГУ, 1973. – 20 с.