

ПОЛУЧЕНИЕ ИСХОДНОГО СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА СОРТОВ ВИШНИ, ЧЕРЕШНИ И ЕЁ ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ ЗАРОДЫШЕЙ *IN VITRO*

Коваленко Н.Н., д-р биол. наук, Гладких С.В.

Филиал Крымская опытно-селекционная станция федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (Крымск)

Реферат. В результате проведенных исследований усовершенствован способ преодоления постгамной несовместимости при получении гибридов между видами вишни с использованием культуры зародышей *in vitro*. Уточнена методика приготовления искусственных питательных сред; определен оптимальный период взятия плодов для вычленения зародышей; разработан технологический процесс создания асептических условий при работе с культурой зародышей; разработаны варианты питательных сред для ввода в культуру зародышей вишни, черешни и их отдаленных гибридов.

Ключевые слова: зародыши, вишня, черешня, сорт, гибрид, питательная среда, стерилизация, *in vitro*.

Summary. As a result of the study, a method for overcoming post-gamma incompatibility in the process of obtaining hybrids between cherry species using *in vitro* embryo culture has been improved. The method of preparing the artificial nutrient media is refined; the optimal period of fruit harvesting for the fission of embryos is determined; the technological process of creating the aseptic conditions for working with the embryo culture is developed; the variants of nutrient media for introduction of cherry and sweet cherry embryos and their remote hybrids into the culture have been developed.

Key words: embryos, cherry, the sweet cherry, variety, hybrid, nutrient medium, sterilization, *in vitro*

Введение. В селекции плодовых культур актуальной является проблема создания сортов и подвоев на новой генетической основе. При этом приоритетным направлением становится разработка и использование различных методов биотехнологии. Так, при отдаленной гибридизации зачастую наблюдается постгамная несовместимость, в результате которой становится практически невозможным получение жизнеспособных зародышей, включение в селекционный процесс культивирования зародышей *in vitro* позволяет её преодолеть. Такое культивирование используется для получения целого ряда отдаленных гибридов различных культур, в том числе – косточковых [1-4].

В филиале Крымская ОСС ВИР большое место в селекционном процессе отводится подбору родительских форм, выделению источников и доноров хозяйственно ценных признаков. Особое внимание уделяется дикорастущим видам, носителям биологически важных признаков. При создании новых сортов и подвоев вишни и черешни из числа видовых форм *Cerasus* Mill. привлекаются источники и доноры устойчивости к основным вредоносным заболеваниям, таким как коккомикоз и клостероспориоз.

Получение сеянцев путем проращивания из незрелых семян зародышей, обладающих очень низкой всхожестью, на искусственных питательных средах и доращивания их в условиях *in vivo* позволяет значительно повысить эффективность селекции.

Цель исследований, проведенных в 2017 году, заключалась в усовершенствовании методики для преодоления постгамной несовместимости при получении гибридов сортов вишни, черешни, а также их гибридов на основе культуры зародышей *in vitro*.

Нами были поставлены следующие задачи: оптимизировать методику использования культуры зародышей *in vitro* в селекции видов рода *Cerasus* Mill.; получить новый гибридный материал сортов вишни, черешни и видов вишни на основе отдаленной гибридизации.

Объекты и методы исследований. Работа проведена в лаборатории биотехнологии растений филиала Крымская ОСС ВИР. Растительный материал – плоды (завязь), был получен из отдела генетических ресурсов и селекции плодовых и ягодных культур филиала Крымская ОСС ВИР, а также в результате искусственного опыления растений, выращиваемых в кадочной культуре в теплице лаборатории биотехнологии.

Объектами были зародыши от свободного опыления:

– пяти сортов вишни обыкновенной (Любская, Тургеневка, Игрушка, Шишевская, Шахзада);

– шести сортов черешни раннего срока созревания (Ярославна, Ласточка, Утренняя звезда, Краснодарская ранняя, Валерий Чкалов, Восход) и одного дюка (Чудо-вишня);

– гибридов черешни с видами вишни: В.Сахалинская × черешня 2-14; *C.Davikensis* × *C.avium* 17/19; *C.Davikensis* × *C.avium* 31/90; черешня сорта Крупноплодная × В.Сахалинская 44-2; черешня Крупноплодная × В.Сахалинская 47-3; черешня Крупноплодная × В.Сахалинская 52/1; черешня Крупноплодная × В.Сахалинская 54-4; (В.Сахалинская × черешня) × вишня обыкновенная.

В исследовании руководствовались методическими рекомендациями А.И. Здруйковской-Рихтер [5], Ю.Р. Попова [6], Н.В. Кухарчик [7]. Зародыши выделяли из плодов в асептических условиях ламинарных боксов марки ВЛ-12 и высаживали в стеклянные пробирки диаметром 30 мм с питательной агаризированной средой объемом 20 мм.

Съем плодов производился в несколько сроков в соответствии с поступлением гибридного материала, вводимого в культуру *in vitro* (на 28 и 32 день после фазы массового цветения). Плоды очищали от кожицы и мякоти до косточки и помещали в чашках Петри в холодильник ($t=+7 \pm 1$ °С). Для ввода в культуру брали по 30-40 косточек, отмывали в водном растворе перманганата калия (24 мг на 1 л воды). Скарификация косточки и обеззараживание проводились водным раствором активного хлора (5 г/л) в стерильных условиях ламинар-боксов с экспозицией 5 и 15 мин. Затем следовала трехкратная отмывка в стерильной дистиллированной воде. Из общего числа косточек сортов черешни и вишни, а также отдаленных гибридов с видами вишни отбирали наиболее сформированные зародыши и по 20 штук в стерильных условиях боксов высаживали на ранее приготовленные питательные среды. Всего в мае-июне высажено 1262 зародыша сортов черешни; 666 зародышей сортов вишни обыкновенной и 246 зародышей отдаленных гибридов черешни с видами вишни.

Обсуждение результатов. Для обеспечения успешности гибридного процесса селекционеру необходимо не только провести большое число скрещиваний, собрать много гибридных плодов, но и увеличить всхожесть семян в целях получения для дальнейшего отбора достаточного количества жизнеспособных семян. При межвидовой и, в особенности при межродовых скрещиваниях плодовых растений, получение жизнеспособного гибридного потомства из-за недостаточного количества завязывающихся плодов, непрорастания семян и стерильности полученных гибридов во многих случаях затруднено, что сводит на нет усилия селекционеров, тормозит широкое внедрение в практику метода отдаленной гибридизации.

Накопленный опыт свидетельствует о перспективности применения культуры зародышей *in vitro* для повышения результативности отдаленных скрещиваний [1-4, 8]. В связи с этим нами была продолжена работа по усовершенствованию метода отдаленной гибридизации для получения исходного селекционного материала сортов вишни, черешни и отдаленных её гибридов на основе использования культуры зародышей.

В процессе работы с культурой зародышей *in vitro* важным является отработка методики приготовления искусственных питательных сред, а также правильный выбор минерального и гормонального её состава.

Методика приготовления искусственных агаризированных питательных сред. В результате исследований уточнена методика приготовления искусственных агаризированных питательных сред для выращивания семян сортов вишни, черешни и её гибридов с видами вишни. Она состоит из этапов, которые можно объединить в следующую последовательность: приготовить основные маточные растворы макро- и микроэлементов → отмерить необходимое их количество, а также хелата железа, витаминов и фитогормонов и слить их в сосуд (колбу, цилиндр и т.п.) → добавить к ним растворенную в небольшом количестве сахарозу и доведенный до кипения в дистиллированной воде агар-агар → довести до заданного объема дистиллированной водой → разлить в культуральные сосуды (пробирки, стаканы и т.п.) → стерилизовать в автоклаве в течение 30 минут под давлением в одну атмосферу.

*Оптимизация питательных сред для ввода в культуру *in vitro* гибридов рода *Cerasus* Mill.* Непосредственно в день сбора плодов зародыши высаживались на различные модифицированные варианты заранее приготовленных питательных сред: Мурасиге и Скуга (M-S) (1962) и *Prunus*, с добавлением витаминов, фитогормонов, а также сахарозы от 10 до 30 г/л. Всего включено в испытание пять ранее отобранных модифицированных питательных сред: M₂, M₃, M₄ и M₅ (на основе M-S) и одна Pr₁ (на основе *Prunus*) (табл. 1).

Таблица 1 – Минеральный состав питательных сред, мг/л включенных в изучение

Компонент	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	Pr ₁
Макроэлементы					
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650	1650	400
KN ₀₃	1900	1900	1900	1900	1800
KH ₂ PO ₄	270	270	270	270	270
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	370	370	370	180
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	-	-	-	-	33,2
CaCl ₂	33,2	33,2	33,2	33,2	-
Хелат железа					
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
N ₂ ЭДТА 2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
Микроэлементы					
MnSO ₄ 5H ₂ O	24,1	24,1	24,1	24,1	0,76
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
KJ	0,83	0,83	0,83	0,83	0,08
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025

В результате многочисленных опытов выделены оптимальные питательные среды для ввода в культуру зародышей в соответствии с их принадлежностью к культуре и сорту. Так, для культивирования сортов черешни раннего срока созревания лучшими в наших опытах были две модифицированные питательные среды на основе среды Мурасиге и Скуга (1962) и *Prunus* (табл. 2). На них хорошо развивались (от 30 до 50 % от введенных в культуру зародышей) сорта черешни Утренняя звезда, Краснодарская ранняя, Восход.

При изучении влияния состава питательных сред на рост и развитие зародышей сортов вишни обыкновенной из шести вариантов питательной среды выделено в результате опытов три модификации М-S (табл. 3).

Таблица 2 – Оптимальные варианты питательных сред для введения в культуру *in vitro* зародышей сортов черешни раннего срока созревания плодов

Компоненты п/среды	Модифицированные питательные среды	
	М-S	Prunus
Основной состав, мг/л	по прописи	по прописи
Витамины, мг/л	В ₁ – 0,1; мезоинозит – 100,0	В ₁ – 0,5; В ₆ – 0,5; РР – 0,5; С – 2,0
Аминокислоты, мг/л	глутамин – 2,0	–
Фитогормоны, мг/л	6-БАП – 0,2	6-БАП – 0,5
Сахароза, г/л	10,0	30,0
рН	5,6	5,7

Таблица 3 – Оптимальные варианты питательных сред для введения в культуру *in vitro* зародышей вишни обыкновенной

Компоненты, мг/л	Варианты питательной среды Мурасиге и Скуга		
	М ₂	М ₃	М ₅
Витамины	В ₁ – 0,1; В ₆ – 0,5; РР – 0,4; С – 1,0	В ₁ – 0,5; В ₆ – 0,5; РР – 0,2; С – 1,0	В ₁ – 0,1; В ₆ – 0,4; РР – 0,3; С – 1,5
Аминокислоты	мезоинозит – 100,0	мезоинозит – 100,0 глицин – 2,0	мезоинозит – 100,0 глутамин – 0,2
Фитогормоны	6БАП-0,5	кинетин – 0,2 ГК-0,5	6БАП-0,2 α-НУК – 0,5
Сахара, г/л	сахароза – 30,0	сахароза – 20,0	сахароза – 10,0

Гибриды, полученные от скрещивания сортов черешни с видами вишни, генетически очень разнообразны и требуют более тщательного индивидуального подхода к выбору состава питательных сред. На данном этапе исследований из их числа нами отобрано две (табл. 4).

Таблица 4 – Варианты питательной среды для введения в культуру *in vitro* зародышей гибридов черешни с видами вишни

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

Создание асептических условий при работе с культурой зародышей, оптимальных условий для их развития и оценка состояния сеянцев. В ходе работы определена оптимальная технологическая цепочка, предусматривающая стерильность получения исходного ма-

териала и дальнейшую работу с ним в асептических условиях. Она заключается в следующем: мытье и сушка химической посуды → стерилизация посуды, инструментов (скальпели, пинцеты, иглы и т.п.), фольги сухим жаром → приготовление искусственных питательных сред → их стерилизация под давлением → подготовка комнаты и ламинарных боксов → ввод в культуру → культивирование зародышей *in vitro* в условиях светозала.

Культивирование зародышей проводили в светозале при постоянной температуре воздуха $+23 \pm 1$ °С в закрытых пробирках, размещенных в штативах и выставленных на стеллажи при освещении 2,5-3,0 тыс. люкс с 16 часовым фотопериодом. Применялся регулярный осмотр растений (1 раз в 10 дней). При этом выявляли не только инфицированные зародыши, но и определяли интенсивность развития жизнеспособных. С этой целью была выработана шкала развития зародышей, и оценка производилась в баллах:

- 0 – нет развития;
- 1 – очень слабое развитие: из верхушечной почки нет прироста;
- 2 – слабое развитие, когда из верхушечной почки появился новый лист;
- 3 – умеренное развитие: есть прирост из верхушечной почки;
- 4 – хорошее развитие: растение имеет хороший прирост из верхушечных и боковых почек и развитие корневой системы.

Начало роста (проростки) зародышей от высадки в культуру *in vitro* (с 20-х чисел мая) фиксировали уже в июне-июле. К их числу относятся шесть гибридов черешни с видами вишни в количестве 18 введенных в культуру *in vitro* на питательной среде М₂ и 15 штук – на среде М₅, а также трех сортов черешни (Ласточка, Утренняя звезда и Краснодарская ранняя) в количестве 7 штук, введенных в культуру *in vitro* на питательной среде М₄. Часть зародышей, введенных в культуру, оказалась инфицирована, поэтому выбраковка по степени их «зарастания» проводилась сначала через каждые 3-5 дней, затем – через десять.

Процент инфицированности семени в этом году колебался от 0 до 100 в зависимости от предварительной обработки косточки и ядра, срока ввода в культуру и, особенно, от происхождения самого гибридного зародыша. В варианте опыта с обеззараживанием раствором активного хлора в течение 5 мин. «зарастание» высаженных зародышей было более активное и в июне-начале июля доходило по сортам черешни в среднем до 48,9 % (табл. 5). По зародышам сортов вишни значения инфицированности были ещё выше – 54,4 % (табл. 6).

Таблица 5 – Инфицированность зародышей черешни, введенных в культуру *in vitro*

Сеянцы сортов черешни	Питательная среда /дата ввода									
	М ₃		М ₄		М ₅		Pr. ₁		всего	
	19.05	инфицировано, шт.	29.05	инфицировано, шт.	31.05	инфицировано, шт.	24.05	инфицировано, шт.	введено, шт.	инфицировано, шт.
Ярославна	20	12	20	7	20	8	20	18	80	45
Ласточка	17	9	8	2	18	8	14	10	57	29
Утренняя звезда	20	18	16	1	20	9	20	7	76	35
Чудо вишня	20	0	20	17	20	3	20	6	80	26
Краснодарская ранняя	20	13	22	15	20	7	20	19	82	54
Валерий Чкалов × Лапинс	20	7	19	1	20	8	20	9	79	25
Восход	20	18	20	2	20	16	20	11	80	47
ВСЕГО:	137	77	125	45	138	59	134	80	534	261

Таблица 6 – Инфицированность зародышей сортов вишни, введенных в культуру *in vitro*

Сеянцы сортов вишни	Количество выбракованных							
	среда /дата ввода						всего	
	M ₂		P _{r1}					
	02.06. введено, шт.	инфицировано, шт.	06.06. введено, шт.	инфицировано, шт.	19.06. введено, шт.	инфицировано, шт.	введено, шт.	инфицировано, шт.
Любская	20	3	20	16	30	5	70	24
Тургеневка	20	1	20	20	30	29	70	20
Игрушка	20	4	20	18	30	24	70	46
Шишевская	20	0	20	20	30	10	70	30
Шахразада	20	3	20	17	20	13	60	33
ВСЕГО:	100	11	100	91	140	81	340	185

Количество выбракованных после ввода в культуру (ревизии в светозале) в среднем по группе образцов гибридов черешни с видами вишни составляет от 0 % в комбинациях Ч.Крупноплодная × С.сахалинская № 47-3 и 52/1 до 100 % в исходной комбинации № 54-4.

Отработка методики стерилизации зародышей. Для уменьшения инфекционного фона после высадки *in vitro* нами создавались асептические условия для зародышей перед их высадкой. В ходе опытов отработана следующая схема: отмывка раствором моющего средства → 1,5 часовая промывка проточной водой → стерилизация в течение пяти минут 0,1 % раствором стерилизующего вещества → пятикратная промывка (стерильной) дистиллированной водой с экспозицией по пять минут.

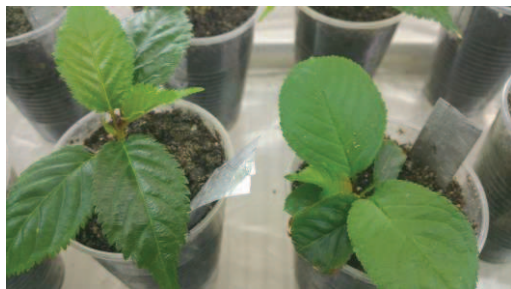
Стерилизующим веществом для зародышей является диоксид или гипохлорит натрия. В опытах использовались: бытовой препарат «Белизна» в объемном соотношении с дистиллированной водой 1 : 2; гипохлорит натрия или кальция (5-9 %); препарат *HAZ-TABS* на основе действующего вещества дигидратнатриевой соли дихлоризоциановой кислоты (2,5 г Cl).

Стерилизация только косточки хлорсодержащим препаратом привела к значительным выпадом из-за заражения. Так, у сеянцев вишни обыкновенной используемых пяти сортов посадки 17.05. выпало (в среднем) 53 %, 18.05. – 45%; 06.06. – до 62 %. У гибридов черешни посадки во II-III декадах мая инфицировано от 16 до 59,7 % зародышей.

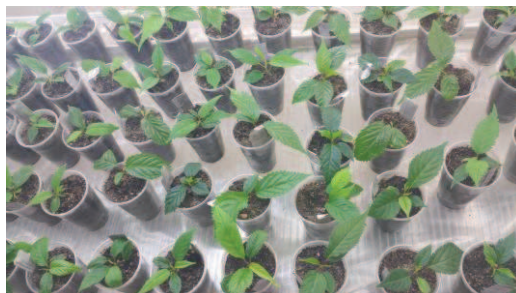
В борьбе с инфицированностью растительных образцов наиболее эффективной была обработка не только косточки перманганатом калия в течение 90 мин., но и после её скарификации так же и самого ядра хлорсодержащим препаратом *HAZ-TABS* (1 т на 0,5 л воды) в течение 15 минут в стерильных условиях ламинарного бокса, что позволило снизить инфицированность в два раза. При этом, перед высадкой в пробирки с питательной средой, промывали обработанные ядра бидистиллированной водой три раза по 5 минут. Такая обработка семени значительно уменьшила их инфицированность, а зародыши остались жизнеспособными.

В результате работы по преодолению постгамной несовместимости между видами вишни и черешни при скрещивании получен принципиально новый селекционный материал. От гибридизации весной 2017 года уже на начало февраля 2018 года выращены сеянцы в количестве:

- черешни: Утренняя звезда – 11, Краснодарская ранняя – 4, Восход – 2, Чудо-вишня – 2;
- вишни: Тургеневка – 4, Игрушка – 2, Шишевская – 4;
- гибридов черешни с видами вишни: В.Сахалинская × черешня 2/14 – 41; С.*Davikensis* × С.*avium* 17/19 – 33; черешня Крупноплодная × В.Сахалинская 47/3 – 52; черешня Крупноплодная × В.Сахалинская 52/1 – 2 (рис.).



а) сеянцы вишни



б) сеянцы отдаленных гибридов черешни

Рис. Сеянцы от гибридизации 2017 года, полученные из культуры *in vitro*

Использование метода культуры зародышей *in vitro* увеличивает выход селекционного материала отдаленных гибридов до 50-60 %.

Выводы. В результате проведенных исследований получено несколько разработок для усовершенствования методики преодоления постгамной несовместимости при получении гибридов между видами вишни на основе культуры зародышей *in vitro*:

- уточнена существующая методика приготовления искусственных агаризированных питательных сред;
- для стерилизации зародышей на этапе ввода в культуру от сапрофитной микрофлоры рекомендован препарат HAZ-TABS (дигидратнатриевой соли дихлоризоциановой кислоты) в количестве одна таблетка на 0,5 л воды;
- показано, что для уменьшения процента инфицированных зародышей необходима обработка помимо косточки, также самого ядра в условиях бокса;
- определен технологический процесс асептических условий при работе с культурой зародышей;
- оптимизирован состав искусственных питательных сред для ввода в культуру *in vitro* зародышей сортов вишни, черешни и её гибридов с видами вишни на основе солей питательных сред *Prunus* и Мурасиге и Скуга (1962) и выделены конкретные из них для определенных объектов по программе селекции.

Литература

1. Захарченко, В.В. Использование культуры изолированных зародышей черешни в селекции на раннеспелость / В.В. Захарченко, Л.Л. Бунцевич // Генетические ресурсы культур растений: тезисы докладов межд. науч.-практ. конф. (13–16 ноября 2001 г.). – СПб., 2001. – С. 287–288.
2. Курсаков, Г.А. Опыт применения искусственной культуры зародышей при отдаленной гибридизации сливы / Г.А. Курсаков // Труды ЦГЛ им. И.В. Мичурина. – 1967. – Т. 9. – С. 120–126.
3. Курсаков, Г.А. Применение искусственной культуры зародышей *in vitro* при отдаленных скрещиваниях косточковых культур / Г.А. Курсаков // Труды ЦГЛ им. И.В. Мичурина. – 1974. – Т. 15. – С. 11–22.
4. Коваленко, Н.Н. Эмбриокультура в селекции косточковых плодовых и декоративных культур / Н.Н. Коваленко, Н.В. Поливара // Субтроп. и декоратив. садоводство: научные труды ГНУ ВНИИЦиСК. – Сочи: ГНУ ВНИИЦиСК 2014. – Вып. 51. – С. 200–206.
5. Здруйковская-Рихтер, А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений / А.И. Здруйковская-Рихтер. – М., 1974. – 60 с.
6. Оздоровление и размножение: методические указания / сост. Ю.Г. Попов. – М.: ВАСХНИЛ, 1979. – 29 с.
7. Кухарчик, Н.В. Методика культивирования изолированных зародышей вишни и сливы / Н.В. Кухарчик, М.С. Кастрицкая, Р.М. Пугачев // Плодоводство / ИП НАН Беларуси. – 2006. – Т. 18. – Ч. 2. – С. 157–162.
8. Коваленко, Н.Н. Оценка развития эксплантов вишни на этапе ввода в культуру *in vitro* / Н.Н. Коваленко, Н.В. Поливара // Северная вишня: III Всеросс. симп. косточковедов: сб. науч. тр. – Челябинск, 2015. – С. 144–147.