

ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТУРЫ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ПЕРСИКА И НЕКТАРИНА НА РАННИХ ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ

Голубев А.М.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока»,
лаборатория молекулярно-генетической селекции плодовых культур
(Саратов)*

Реферат. Целью настоящего исследования была отработка технологии культуры *in vitro* незрелых зародышей персика и нектарина на ранних этапах развития. Показано, что культура незрелых зародышей зависит как от состава среды, так и от генотипа. Выявлено, что для введения в культуру лучше использовать среды М2Аб и Э-26. Для субкультивирования морфогенных каллусов и повышения эмбриогенности тканей следует использовать среды Э-26 и 2Э8. Размножение и рост микропобегов успешно проходило на средах СКК1М и 2Р12М. Укоренение можно осуществлять на среде 2У65М2 или по типу зелёного черенкования, если микропобеги подросли до 25-30 мм. Отработана технология культуры незрелых зародышей, которая будет совершенствоваться.

Ключевые сорта: персик, нектарин, незрелые зародыши, морфогенные ткани, эмбриоподобные структуры

Summary. The aim of this study was to develop *in vitro* culture technology of immature embryos in the early stages of development. It was found that the culture of immature embryos depends on both the composition of the medium and the genotype. It was revealed that for introduction into the culture it is better to use M2Ab and E-26 medium. E-26 and 2E8 medium should be used to subculture morphogenic callus and increase in tissue embryogenicity. The propagation and growth of microshoots successfully passed on SKK1M and 2P12M medium. Rooting can be carried out on 2U65M2 medium or by the type of green cuttings, if microshoots have grown to 25-30 mm. The technology of immature embryo culture has been developed and it will be improved.

Key words: peach, nectarine, immature embryos, morphogenic tissues, embryo-like structures

Введение. При селекции персика и нектарина на раннеспелость, а также при отдалённой гибридизации возникают трудности, связанные с недоразвитием семени или абортацией зародышевого мешка на ранних этапах развития, что приводит к плохой всхожести косточек или массовому июньскому опадению завязи. В решении данной проблемы могут помочь биотехнологические методы эмбриокультуры на ранних стадиях развития, хотя и здесь есть свои нерешённые вопросы. Так, известна закономерность, чем на более ранних этапах изолируется зародыш, тем труднее добиться его дозревания и получения из него полноценного растения [1-3].

Объекты и методы исследований. Исследования проводились по общепринятым методикам культуры органов и тканей растений [4-6] В работе использовали сорта нектарина Краснодарец и Сильвер Роме, сорт персика Фаворита Мореттини, сортообразцы персика Саратовский ранний, Саратовский-33. В качестве эксплан-

тов использовали незрелые зародыши в возрасте 21, день после окончания цветения растений, произрастающих в поликарбонатной теплице с температурой 24-26 °С. Стерилизацию проводили 5 % хлорамином (30 мин.) или 5 % гипохлоритом натрия (10 мин). После поверхностной стерилизации и 3-х кратной промывки стерильной дистиллированной водой зародыши вычленились в асептических условиях и помещались в пробирки на различные варианты питательных сред.

Штативы с посаженными незрелыми зародышами помещались в темную комнату с кондиционируемой температурой 25 °С. Эффект сред оценивался после 45 дней культивирования, после чего морфогенные ткани пересаживались на среды для субкультивирования и индукции органогенеза. Эффект сред для субкультивирования оценивали также через 45 дней. Культуры на средах для органогенеза выставлялись в световую комнату с температурой 22-24 °С и 16 часовым фотопериодом. Исследования проводили в 2-х повторах, при этом в каждом эксперименте использовали не менее 15-20 первичных эксплантов.

Обсуждение результатов. Для введения в культуру *in vitro* незрелых зародышей персика и нектарина на ранних стадиях их развития была испытана питательная среда «M2Ab», разработанная нами ранее [7] для поддержания жизнеспособными меристем косточковых культур малого размера. Данная среда обогащена сильным антиоксидантом – аскорбиновой кислотой и кондиционирующим фактором – глутатионом (табл. 1).

Таблица 1 – Состав питательных сред, использованных при культивировании персика и нектарина

Состав среды	Среда M ₂ Ab для введения в культуру <i>in vitro</i>	Среда Э26 для индукции морфогенного каллуса	Среда Э28 для дозревания эмбриоподобных структур	Среда СКК1М для индукции адвентивных почек	Среда 2P12M для роста микропобегов
Макросоли	по MS	по MS	по MS	по MS	по MS
Микросоли	по MS	по MS	по MS	по MS	по MS
Fe-хелат	по MS	по MS	по MS	по MS	по MS
Вит.: В1	1 мг/л	0,1 мг/л	0,1 мг/л	0,5 мг/л	1 мг/л
В6	1 мг/л	0,5 мг/л	0,5 мг/л	0,5 мг/л	1 мг/л
PP	1 мг/л	0,5 мг/л	0,5 мг/л	0,5 мг/л	1 мг/л
С	30 мг/л	1 мг/л	1 мг/л	30 мг/л	30 мг/л
Са-пантотенат	1 мг/л	0,5 мг/л	0,5 мг/л	1 мг/л	1 мг/л
Биотин	0,5 мг/л	0,1 мг/л	0,1 мг/л	0,5 мг/л	0,5 мг/л
Цистеин	---	10 мг/л	---	---	---
Глицин	2 мг/л	0,2 мг/л	2 мг/л	2 мг/л	2 мг/л
Глутатион	100 мг/л	---	---	20 мг/л	30 мг/л
ИПА	0,5 мг/л	---	---	0,5 мг/л	0,3 мг/л
Транс-зеатин	---	---	---	---	0,5 мг/л
6-БАП	0,5 мг/л	---	1 мг/л	0,5 мг/л	0,5 мг/л
ТДЗ	0,1 мг/л	1 мг/л	0,3 мг/л	0,25 мг/л	0,2 мг/л
АБК	---	---	0,001 мг/л	---	---
НУК	---	0,3 мг/л	0,5 мг/л	---	0,01 мг/л
ИМК	0,01 мг/л	---	---	0,01 мг/л	---
AgNO ₃	---	---	---	0,1 мг/л	0,5 мг/л
Инозит	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л
Сахароза	20 г/л	30 г/л	30 г/л	20 г/л	20 г/л
Глюкоза	10 г/л	---	---	10 г/л	10 г/л
Агар	5,5 г/л	6 г/л	6 г/л	5,5 г/л	5,5 г/л
pH	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6

Вторым вариантом служила среда Э26, содержащая высокую концентрацию мощного, неполярного, синтетического цитокинина – тидиазурона (ТДЗ) и умеренную концентрацию неполярного ауксина – β -нафтилуксусной кислоты (НУК). В третьем варианте, в среде 2Э8, концентрация тидиазурона уменьшена, но введён другой неполярный цитокинин – 6-бензиламинопурин (6-БАП) и добавлен ингибитор линейного роста – абсцизовая кислота (АБК).

Эффект сред оценивали по спектру образующихся на них тканей, проценту индукции морфогенного каллуса и структур, проценту неморфогенного каллуса. Выявлено, что морфогенными были три типа каллуса – плотный серого цвета; с оттенками от светло-зелёного до светло-жёлтого, а также жёлтый бугристый. На них образовывались белый плотный, непрозрачный каллус и эмбриоподобные структуры. На свету морфогенные ткани зеленели и образовывали очаги органогенеза. Наибольшее разнообразие образующихся видов каллуса наблюдалось на среде М2Аб (табл. 2)

Таблица 2 – Спектр тканей персика и нектарина на разных питательных средах

Среда	Разнообразие разросшегося каллуса на средах в 0 пассаже									
	Первичный каллус			Морфогенные образования				Неморфогенный каллус		
	Серый бугристый	Светло-зелёный - светло-жёлтый	Жёлтый бугристый	Белый плотный каллус	Эмбрио-подобные структуры	Очаги органогенеза	Зачатки листьев	Бесцветный прозрачный	Белый прозрачный	Некроз
Краснодарец (нект.)										
М2Аб	15,4%	25,6%	5%	5%	2,6%	12,8%	7,7%	2,6%	4,4%	12,8%
	46%			28,1%				19,8%		
Сильве Роме (нект.)										
М2Аб		23%			23%					54%
	23%			23%				54%		
Э-26	16,7%	16,7%		16,7%			16,7%		33,2%	
	33,4%			33,4%				33,2%		
2Э8		12,5%						25%	25%	37,5%
	12,5%			0				87,5%		
Саратовский -33 (перс.)										
М2Аб	7,7%	7,7%	15,4%		7,7%					61,5%
	30,8%			7,7%				61,5%		
Э-26		12,5%	12,5%		12,5%					62,5%
	25%			12,5%				62,5%		
2Э8										100%
	0			0				100		
Саратовский ранний (перс.)										
М2Аб		8,3%		16,7	8,3%					66,7%
	8,3%			25%				66,7%		
Э-26			9%						9%	82%
	9%			0				91%		
2Э8		4,5%		4,5%	9%					82%
	4,5%			13,5%				82%		
Фаворита Мореттини (перс.)										
М2Аб			7%		4%		4%			85%
	7%			8%				85%		

Среда М2Аб обеспечила образование морфогенных структур у всех генотипов (рис. 1). Наибольший процент морфогенного каллуса образовал нектарин Краснодарец. Менее эффективная эта среда была для раннеспелого персика Фаворита Мореттини.

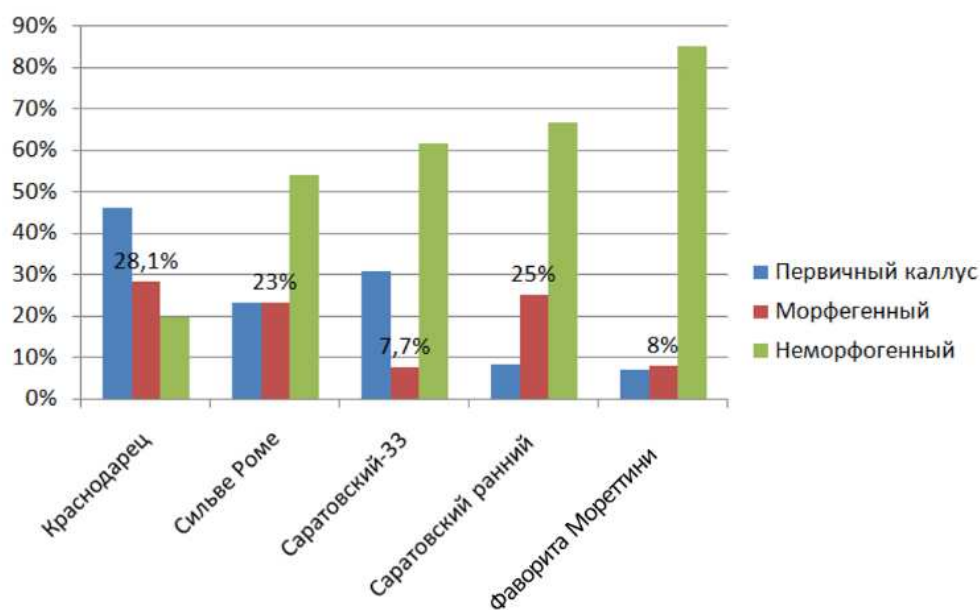


Рис.1. Баланс типов каллуса у разных сортов на среде М2Аб в 0 пассаже

Среда Э-26 для некоторых сортов была более эффективна (рис. 2). Так сорт нектарина Сильве Роме показал максимальный процент (33,4 %) формирования морфогенного каллуса. Более отзывчив на данную среду был и наиболее зимостойкий сортобразец персика Саратовский-33, который образовал 12,5 % морфогенного каллуса по сравнению с 7,7 % на среде М2Аб. Данная среда непригодна для введения в культуру сортобразца Саратовский ранний, который не образовывал на ней морфогенных тканей и очень мало (9%) формировал первичного каллуса.

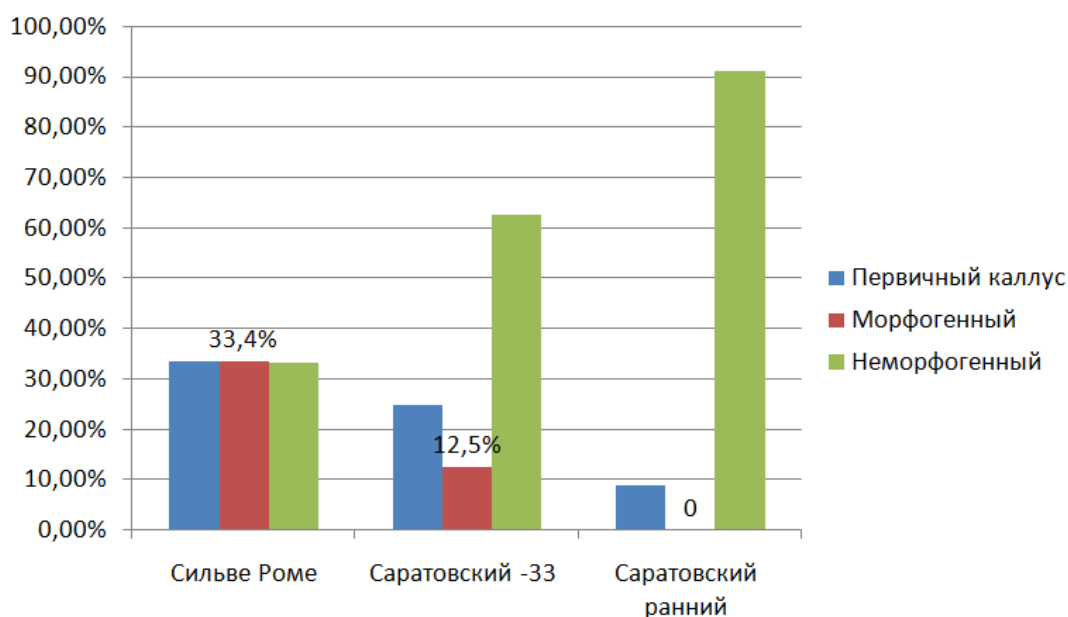


Рис. 2. Баланс типов каллуса на среде Э-26 в 0 пассаже

Среда 2Э8 поддерживала морфогенную активность только у незрелых зародышей персика Саратовский ранний (рис. 3).

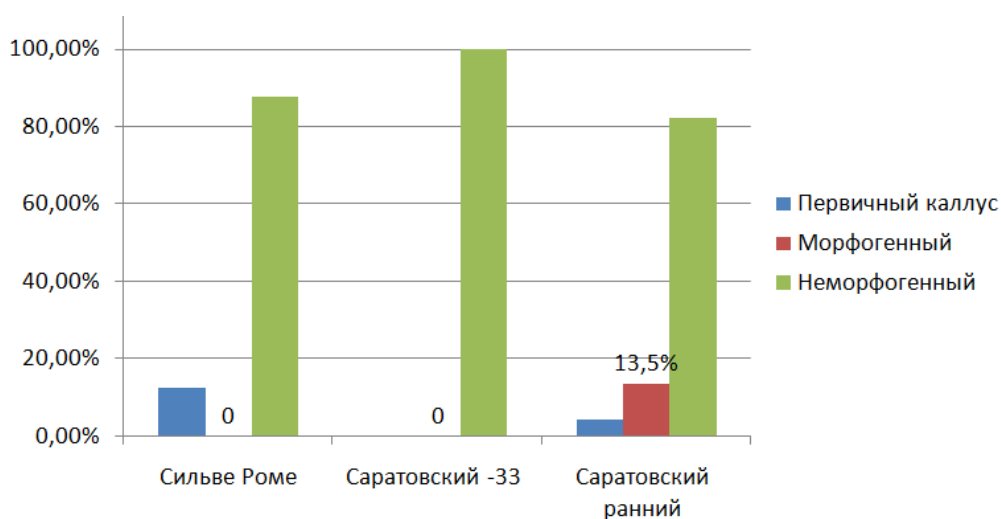


Рис. 3. Баланс типов каллуса на среде 2Э8 в 0 пассаже

Таким образом, морфогенная активность незрелых зародышей зависит как от состава среды, так и от специфики генотипа. Для введения в культуру незрелые зародыши персиков и нектаринов предпочтительно сажать на две среды – М2Аб и Э-26.

В целях получения большего количества морфогенного каллуса, белые плотные ткани и эмбриоподобные структуры пересаживались на свежую среду того же или другого состава (табл. 3).

Таблица 3 – Изменение спектра тканей персика и нектарина в культуре *in vitro* после пересадки эмбриоподобных структур на свежую среду того же или другого состава

Среда	Разнообразие разросшегося каллуса на средах в 1 пассаже									
	Первичный каллус			Морфогенные образования				Неморфогенный каллус		
	Серый бугристый	Светло-зелёный-светло-жёлтый	Жёлтый бугристый	Белый плотный каллус	Эмбриоподобные структуры	Очаги органогенеза	Зачатки листьев	Бесцветный прозрачный	Белый прозрачный	Некротичные ткани
Сильве Роме (нект.)										
со среды М2Аб на Э26	5,9%		17,6%	11,8%	29,4%	11,8				23,5%
	23,5%			53%				23,5%		
со среды М2Аб на 2Э8		14,3%	14,3%		42,9	7,1%		7,1%		14,3%
	28,6%			50%				21,4%		
со среды 2Э8 на 2Э8	8,3%		8,3%	8,3%	25%					50,1%
	16,6%			33,3%				50,1%		
Саратовский ранний (персик)										
со среды М2Аб на 2Э8	17,6%	5,9%	17,6%	5,9%	29,5%					23,5%
	41,1%			35,4%				23,5%		
со среды 2Э8 на 2Э8		28,6%		57,1%						14,3%
	28,6%			57,1%				14,3%		

Испытания показали, что для субкультивирования подходит как среда Э26, так и среда 2Э8, причём эмбриогенность тканей повышается почти вдвое. Выставляя культуры тканей на свет и пересаживая их на среды СКК1М и 2Р12М можно размножить ценные генотипы до нужного количества (рис. 4).

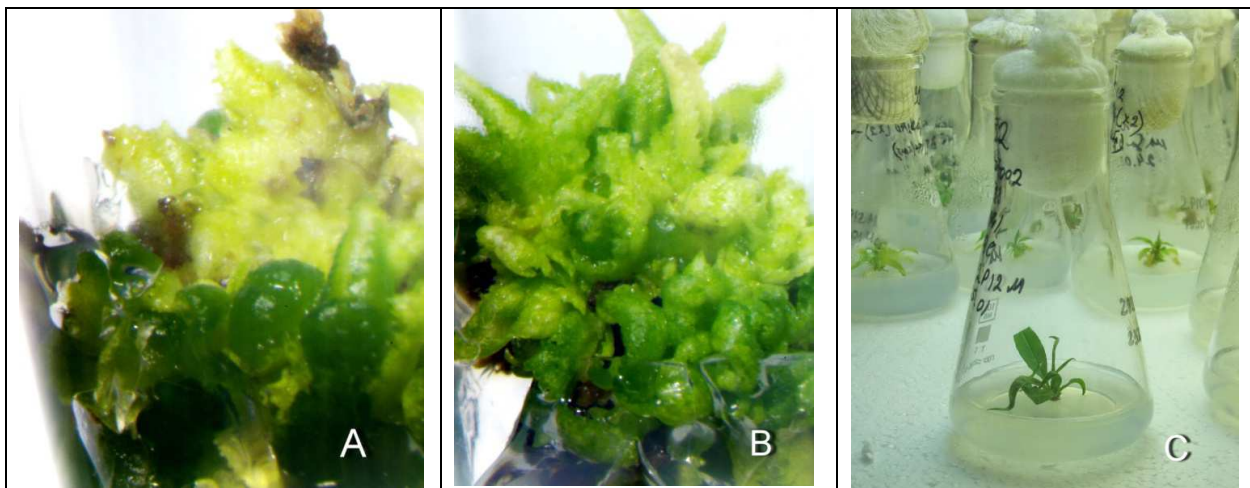


Рис. 4. Индукция образования микропобегов на среде СКК1М (А, В) и их рост на среде 2Р12М (С) перед укоренением

Укоренение проводили на среде 2У65М2, разработанной нами ранее для абрикоса. Адаптация регенерантов осуществляется по той же схеме, что и для абрикоса [7].

Заключение. Исследование показало, что чем меньше эксплант, тем тщательнее необходимо подходить к подбору среды. Для незрелых зародышей меньше 5 мм среда должна содержать антиоксиданты (аскорбиновая кислота, цистеин и др.) и кондиционирующий фактор – трипептид глутатион. Для получения растений из незрелых зародышей маленького размера лучше применить процесс вторичного эмбриогенеза, чем дорастивать их до зрелого состояния.

Литература

1. Здруйковская-Рихтер А.И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений. Ялта: Крым-Фарм-Трейддинг, 2003. 368 с.
2. Применение биотехнологических методов в получении селекционных форм персика (*P. Persica* (L.) Vatch) и абрикоса (*P.Armenica* L.) / Н.П. Лесникова-Седощенко [и др.] // Труды Никит. ботан. сада. 2007. Т. 128. С. 33-39.
3. Саенко И.Н. Эмбриокультура нектарина и алычи в связи с задачами селекции. // Труды Никитского ботанического сада. 2005. Том 125. С. 131-145.
4. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука. 1964. 270 с.
5. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*. М.: ВАСХНИЛ, 1974. 60 с.
6. Калинин Ф.Л., Сариаккая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 488 с.
7. Голубев А.М. Клональное микроразмножение некоторых генотипов абрикоса в культуре апикальных меристем и высечек листьев. // Сборник научных трудов ГНБС. 2017. Том 144. Часть II. С. 64-69.