

## ЭМБРИОКУЛЬТУРА НЕКТАРИНА И АЛЫЧИ В СВЯЗИ С ЗАДАЧАМИ СЕЛЕКЦИИ

И.Н. САЕНКО

Большое экономическое значение имеет расширение сроков потребления свежих фруктов населением за счет выращивания сортов раннего и сверхраннего сроков созревания. Из косточковых плодовых культур, выращиваемых в условиях Крыма и различных регионах Украины, у местного населения и многочисленных отдыхающих значительной популярностью пользуются раннеспелые сорта алычи (*Prunus cerasifera* Ehrh) и нектарина (*Persica vulgaris* Mill. *subsp.* *Nectarina* Ait. Shof.). Их плоды имеют универсальное использование, т.е. потребляются в свежем и переработанном виде.

Алыча – ценная пищевая и лекарственная культура, содержащая витамины, пектины, жирное масло, углеводы. Ценным свойством алычи является более раннее созревание плодов подавляющей массы ее сортов по сравнению с сортами сливы домашней (*Prunus domestica* L.). Алыча скороплодна. Привлекает внимание и группа гибридной алычи, ее высокая урожайность, способность плодов дозревать при хранении, хорошая лежкость, транспортабельность [5,6]. Сорта алычи гибридной выведены методом межвидовой гибридизации алычи с сортами других видов сливы и прежде всего с сортами сливы китайской (*Prunus salicina* Lindl.) [3].

Сорта алычи по времени созревания в условиях Крыма делятся на пять групп: I – очень ранние (созревают в середине июня); II – ранние (в начале июля); III – средние (в середине июля); IV – поздние (в конце июля); V – очень поздние (в августе – сентябре) [7].

Нектарин – голоплодный персик. Плоды нектарина имеют более плотную мякоть, чем у персика и значительно лучше переносят транспортировку. Однако многим сортам нектарина свойственна мелкоплодность, сильное повреждение мучнистой росой. Среди имеющихся в Никитском ботаническом саду сортов нектарина мало ранозревающих и очень ранних сортов, созревающих одновременно с ранними сортами персика Майский Цветок и Фаворита Мореттини.

У нектарина, также как и у персика (*Persica vulgaris* Mill.), по сроку созревания плодов в Крыму сорта делятся на шесть групп: I – очень ранние и ранние (созревают в III декаде июня – I и II декадах июля); II – ранне-средние (III декада июля – I декада августа); III – средние (II – III декады августа); IV – средне-поздние (I декада сентября); V – поздние (II – III декады сентября); VI – очень поздние (I – III декады октября) [8].

В Госреестр сортов растений Украины и Крыма на 2004 г. включены три сорта гибридной группы алычи (сливо-алычевые гибриды) селекции Никитского ботанического сада: Десертная (1969 г.), Обильная (1969 г.) и Оленька (1995 г.), созданные в результате межвидовой гибридизации алычи (*Prunus cerasifera*) и сливы китайской (*Prunus salicina*), а также три сорта нектарина: Кримсон Голд (1992 г.), Старк Сангло (1993 г.) – зарубежной селекции и Рубиновый 8 (2001 г.) – селекции Никитского ботанического сада. Сорта алычи Обильная и Оленька относятся к среднему сроку созревания, а Десертная – к очень позднему. Нектарин Кримсон Голд – ранне-среднего срока созревания, Старк Сангло – среднего, Рубиновый 8 – средне-позднего.

В районированном сортименте алычи и нектарина отсутствуют генотипы очень раннего и раннего сроков созревания, что не позволяет обеспечивать население свежей плодовой продукцией в ранне-летний период (июнь-июль). Следовательно, создание новых сортов алычи гибридной и нектарина селекционным путем является крайне необходимым. Плодовые культуры, в том числе сорта алычи и нектарина, сверхран-

него и раннего сроков созревания, образуют неполноценные семена, неспособные развиваться в жизнеспособные растения в обычных условиях выращивания. Их семена с недоразвитыми зародышами гибнут в процессе созревания плодов. Это сильно сужает процесс гибридизации, так как селекционеры не могут их успешно использовать в качестве материнских исходных форм [4]. В связи с этим создание новых сортов алычи и нектарина очень раннего и раннего сроков созревания – актуальная задача.

Целью данной работы было установление возможности развития *in vitro* зародышей нектарина и алычи разных стадий эмбриогенеза для размножения и создания исходного материала плодовых культур для селекции и получения растений раннего и сверхраннего сроков созревания.

### Объекты и методы исследований

В качестве исходного растительного материала использовали семена нектарина и алычи от свободного опыления, искусственного опыления, а также самоопыления разных стадий развития и сроков созревания.

Косточки опускали предварительно в этанол на 1-2 сек., а затем стерилизовали путем обжига в пламени спиртовки. [4]. Все работы по извлечению семян, освобождению их от покровов и окружающих тканей проводили в стерильных условиях бокса Fatran – LF [1].

Изолированные зародыши помещали в пробирки 22 x 160 мм. на искусственные питательные среды различного состава согласно схеме эксперимента. Культуры содержали 1,5 – 2 месяца в освещенном холодильнике, после чего их помещали в освещенные камеры или на СУВР с освещением 2-3 тыс. лк., температурой 22-25° С, фотопериодом 16 ч. для развития проростков. Нормально развитые растения переводили в асептические условия *in vivo*. Почву для горшечной культуры стерилизовали в режиме текучего пара. Для адаптации растения прикрывали стеклянными сосудами, а затем, по мере укоренения и приспособления к почвенным условиям, сосуды убирали.

Изучение каллусогенеза у алычи проводили на гибридных зародышах Кизилташская Ранняя x Вилора и Вилора x Кизилташская Ранняя от реципрокных скрещиваний сортов, у нектарина – на зародышах от свободного опыления сортов Crimson Gold и Рубиновый 4 торпедовидной стадии. Зародыши алычи и нектарина семядольной стадии использовали для получения растений.

Изучение морфогенеза зародышей *in vitro* у ранозревающих сортов и форм нектарина проводили на развивающихся зародышах 13 образцов и 11 гибридных комбинаций скрещивания, в том числе и межвидового гибрида, созданного с участием дикого китайского персика мира *Persica mira* (Koehne) Koval. et Kostina (Нектамира 140-75 x свободное опыление), а также гибрида, полученного в результате межвидовой гибридизации с привлечением дикого персика Давида *Persica davidiana* Carr. (Нектадиана 723-1-91 x (47-94), а также у 4 сортов и гибридных комбинаций алычи: Курортная, Субхи Ранняя, Вилора, Кизилташская Ранняя, Кизилташская Ранняя x Вилора и Вилора x Кизилташская Ранняя.

Изучение морфогенеза завязей и семян изучали на примере гибридной комбинации скрещивания нектарина Хемус x Маугло и у 41-9-3 от свободного опыления.

### Результаты и обсуждение

При исследовании развития зародышей данных плодовых культур разных стадий развития *in vitro* мы изучали пути морфогенеза завязей и семян, а также зрелых и незрелых зародышей, занимающих 1/3, 1/2 или весь объем семени.

У зародышей нектарина ранних стадий эмбриогенеза, которые имели сформированные семядоли, но очень малый размер семени длиной 1,5-3 мм развитие шло по пути каллусогенеза (табл.1). Интенсивность роста каллуса и его качество зависели от генотипа (сорта), соотношения фитогормонов и их состава в питательной среде. Диаметр зародышей за 30 дней культивирования увеличился с 1,5 – 3 мм до 1 – 1,5 см. Развитие происходило главным образом за счет разрастания семядолей. Максимальной величины семядоли достигали в варианте Рубиновый 4 при добавлении 6-БАП 1,5 мг/л.

Таблица 1

Каллусогенез из зародышей раносозревающих сортов нектарина и алычи от свободного опыления

Исходная форма	Дата введения <i>in vitro</i>	Количество (шт.)	
		плодов	семян
Субхи Ранняя	23.05.94	90	90
Курортная	23.05.94	90	90
Early Star	27.07.94	45	71
Super Crimson Gold	03.08.94	13	13
Early Star	10.08.94	47	47
Субхи Ранняя	01.05.95	81	81
Курортная	2.06.95	32	32
Рубиновый 4	19.06.96	53	47
Crimson Gold	20.06.96	54	23

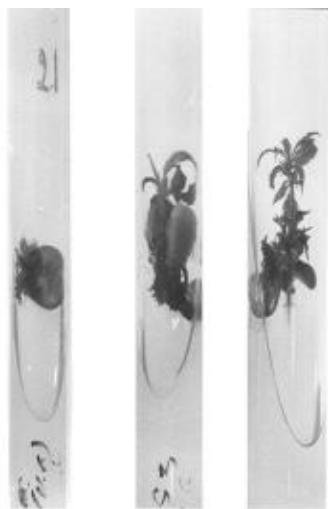
Листовой и стеблевой морфогенез наблюдали у сорта Рубиновый 4 в варианте с 6-БАП 0,2 + ИУК 0,1 мг/л. Однако зародыши сорта Crimson Gold в варианте с 6-БАП 0,2 + 2,4-Д 1 мг/л лучше продуцировали каллус. Он был плотный, зеленого цвета. Ауксин 2,4-Д способствовал образованию более плотного каллуса, чем ИУК.

Известно, что возникновение органов, систем и частей растений *in vitro* определяется соотношением цитокининов и ауксинов в питательной среде [1], поэтому сравнивали влияние фитогормонов на тип морфогенеза у зародышей алычи ранней семядольной стадии развития. В данном случае использовали 6-БАП, кинетин, 2,4-Д. Применение 6-БАП 0,1 мг/л и 2,4-Д 0,22 мг/л вызывало на 14 день культивирования образование и дифференциацию мельчайших структур на семядолях у 52% зародышей. Они были темно-зеленого цвета, локализованы на разных частях семядолей, но в большинстве случаев – по краям, развивались без предварительного образования каллуса на поверхности семядолей. В дальнейшем из них развивались листья и почки. Таким образом, в данных условиях наблюдался листовой и стеблевой органогенез.

В вариантах с кинетином и 2,4-Д зародыши тоже увеличивались, открывались семядоли, выдвигались почки, но дальше, как правило, они деформировались.

У более крупных зародышей алычи, занимавших почти полный объем семени, даже без предварительной стратификации, тоже развивались адвентивные побеги, а также центральный (главный) побег и корни (рис.1.1). Аналогичные явления выявили у абрикоса и черешни W.D. Lane и F. Cossio [11]. В результате сравнения влияния состава питательных сред MS и Монье с различными сочетаниями цитокининов и ауксинов наблюдали образование каллуса только на среде MS в варианте с 6-БАП 0,1 мг/л + ГК 1мг/л. Среди всех вариантов опыта выделялись среды с добавлением 6-БАП 1,13 мг/л и

2,4-Д 0,2 мг/л. На них отмечена стимуляция адвентивных побегов, а также рост побегов и корней, однако на поверхности корней образовывался неморфогенный каллус коричневого цвета. На среде MS во всех вариантах больше образовывалось адвентивных побегов, чем на среде Монье. У них была лучше развита корневая система. Например, на среде Монье получено 11,3% растений с корнями средней и слабой степени развития, а на среде MS – 35,7% растений.



1



2



3



4

Рис. 1. Морфогенез зародышей нектарина и алычи: 1 – формирование адвентивных побегов их зародышей алычи; 2 – проростки нектарина 404-90; 3 – растения алычи, полученные в пробирочной культуре; 4 – проростки нектарина, полученные в пробирочной культуре.

У сорта алычи Субхи Ранняя было очень мало зародышей, которые не развивались после помещения их на питательную среду (8%), в то время как у сорта Курортная таких зародышей было 50% как на свету и с предварительной обработкой пониженной положительной температурой, так и без нее. Однако у Субхи Ранняя отмечено замедление роста на начальных стадиях культивирования у 62% зародышей, а у Курортной у 25%.

При изучении потенциальных возможностей семядолей алычи, их отделяли от осевых органов зародыша. Размер эксплантов составлял 3-4 мм. Использовали среду MS и 7 вариантов сочетания фитогормонов 2,4-Д, ИУК и 6-БАП.

У таких эксплантов побегообразования не происходило по сравнению с более зрелыми зародышами. На 27 день культивирования наблюдали, что экспланты незначительно увеличивались, у них заворачивались края и дальше они не развивались.

У более развитых зародышей нектарина сортов Кримсон Голд и Супер Кримсон Голд, находящихся на семядольной стадии и занимающих 1/3, 1/2 и больший объем семени, развитие шло по пути эмбриогенеза, а затем останавливалось, или шло по пути органогенеза. Так, зародыши, занимавшие 1/3 объема семени, при введении в эмбриокультуру были прозрачными. В течение 20-30 дней они приобретали белую окраску и более плотную консистенцию. Обработка таких зародышей пониженной положительной температурой +5-8°С не способствовала их росту и дальнейшему развитию.

Зародыши, занимавшие 1/2 и больший объем семени различались по темпу развития, который четко зависел от генотипа. Побеговые побеги сорта Crimson Gold от свободного опыления были лучше сформированы и имели листья нормальной формы. Растения сорта Super Crimson Gold от самоопыления чаще всего имели слабо развитый побег с розеткой листьев на верхушке. Кроме того, зародыши развивались в условиях пониженной положительной температуры разное время – 52 и 86 дней. В первой группе оказались растения сорта Crimson Gold, а во второй – растения сорта Super Crimson Gold. По количеству развившихся растений между ними разница была невелика и составила 62,5% и 60,9% соответственно. Корневая система проростков обоих сортов нектарина развивалась с нарушениями в виде расщепления главного корня и с образованием мелких петель.

По нашим наблюдениям, органогенез у морфологически зрелых зародышей нектарина, взятых из окрашенных неспелых плодов, зависел от степени физиологической зрелости зародышей, т.е. от сроков введения в эмбриокультуру; состава питательной среды, количества фитогормонов в ней и генотипа. Так, у очень ранних сортов и гибридных комбинаций скрещивания нектарина качество проростков было ниже, чем у созревающих на 1-2 декады позже. Такие растения плохо приживались *in vivo*. Вероятно, для раносозревающих сортов требуется более тщательная оптимизация питательной среды.

В 1999 году были введены в эмбриокультуру зародыши нектарина семядольной стадии сортов Super Crimson Gold, Armcing Precose, Mayglo и гибридных комбинаций 404-90 и Рубиновый- 4 x Early Star на питательные среды MS и Уайта. Из всех комбинаций быстрее начали прорастать и сформировались нормальные проростки у зародышей сорта Armcing Precose и гибридной комбинации 404-90. Срок их культивирования при пониженной положительной температуре составлял 47 дней, и по срокам созревания они являются более ранними из изучаемых сортов.

Зародыши сортов Mayglo и Super Crimson Gold нуждались в более длительном периоде прорастания в условиях пониженной положительной температуры, этот период составил 65 дней. По качеству значительно отличались проростки гибридной комбинации от проростков сорта Armcing Precose. Их листья располагались по побегу не

очередно, как у *Armcing Presose*, а густыми мутовками на верхушках побегов. Корневая система у растений обеих комбинаций часто имела ненормальный главный корень, например, многочисленные петли у 404-90 (рис. 1.2), а у *Armcing Presose* преждевременно останавливался рост (до 2 см) при отсутствии боковых корней. У проростков сорта *Mauglo* главный корень имел темно-бурое окончание и развивался медленнее, чем корешки проростков выше упомянутых сортов.

Сравнивая влияние питательных сред на количественный выход проростков и растений, лучшей в данных условиях оказалась среда Уайта. У сорта *Mauglo* на среде MS в среднем получено 66,7% растений, а на среде Уайта 91,7%, т.е. для роста и развития незрелых семян нектарина лучшей была среда Уайта. Применение повышенных доз ГК (3 мг/л) в этих средах было благоприятным для роста проростков.

У гибридной комбинации 404-90 на среде MS получено 29,3% растений, на среде Уайта 64,6%; в варианте с ГК 3мг/л получено 87,5% растений, а при обычной концентрации ГК 1 мг/л – 33,3% растений.

Однако, зародыши, введенные *in vitro* на 3-4 недели позже, в 1996 году, например, у сорта *Mauglo* лучше развивались на питательной среде Монье. Среда Монье более богата микроэлементами и некоторыми макроэлементами, чем среды Уайта и MS. На ней было получено 79,6% растений, а на питательной среде MS – 68,2% (табл. 2).

В результате изучения в эмбриокультуре ранних сортов и гибридов нектарина Никитский 85, *Mauglo* и F<sub>1</sub> (Флаус x Фаворита Мореттини) от свободного опыления на средах Монье и MS отмечено хорошее прораствание зародышей у изучаемых сортов и гибридных комбинаций. Эти зародыши занимали почти весь объем семени. Из них получали 52-89% проростков. У зародышей начинали расти корни, раскрывались семядоли, и развивался побег. При переводе проростков из условий пониженной положительной температуры при дальнейшем культивировании наблюдали их неравноценное развитие. Часто после остановки роста главного корня рост побегов продолжался, но через 10-20 дней заметно угнетались верхушечные почки побегов, если к этому времени у таких проростков не образовывались боковые корни.

Таблица 2

Влияние состава питательной среды и генотипа на получение растений нектарина из зародышей от свободного опыления

Сорт	Всего зародышей в опыте, шт.	Зародышей на среде MS, шт.	Получено растений		Зародышей на среде Монье /шт/	Получено растений	
			на среде MS, шт.	%		на среде Монье, /шт/	%
<i>Mauglo</i>	93	44	30	68,2	49	39	79,6
Рубиновый 4	59	29	25	86,2	30	21	70
F <sub>1</sub> (Флаус x Фаворита Мореттини)	76	48	23	47,9	28	7	25

В практике культуры *in vitro* принято условно разделять процесс культивирования эксплантов на этапы. На первом этапе - введения зародышей семядольной стадии в культуру *in vitro* - положительное действие оказало сочетание ГК 0,5-1 мл/л, 6-БАП

0,2-0,7 мг/л и ИМК 0,01 мг/л. На втором этапе - удлинения побегов - содержание фитогормонов изменяли в 2-3 раза, что вызвало удлинение побегов и нарастание листьев в 1,5-2 раза за 7-10 дней. На третьем этапе культивирования зародыши переносили на жидкие среды аналогичного состава для улучшения ризогенеза.

У раносозревающих сортов семена часто бывают физиологически недозрелыми. Так, у ранних сортов нектарина, созревающих во 2-3 декаде июля, при съеме с дерева зеленых и слабо окрашенных плодов, зародыши уже занимали весь объем семени, но очень немногие из них были способны сформировать нормальный проросток. Если высаживали такие зародыши *in vitro*, то получали 13-15% растений даже при обработке пониженной положительной температурой сроком 50-60 дней.

При введении *in vitro* физиологически недозрелых зародышей сорта Mayglo в период созревания плодов получили 23,8% растений, у сорта Никитский-85 при введении на 2 недели ранее получили 13,1% растений. У F<sub>1</sub> (Флаус х Фаворита Мореттини) от свободного опыления при введении *in vitro* в тот же срок – 15,4% растений, у F<sub>1</sub>(Флаус х Фаворита Мореттини) х Рубиновый 4 от искусственного опыления при введении в фазу полной зрелости – 55,6% растений (табл. 3). Аналогичная картина наблюдалась и в другие годы.

Таким образом, зародыши нектарина раносозревающих сортов становятся нормально сформированными и физиологически зрелыми, чтобы развиться в полноценные растения к концу июля – началу августа.

Анализ динамики появления проростков показал, что к началу октября основная часть проростков 77,9% была готова к высадке в почву, это составляло 57,3% от количества всех зародышей в эксперименте.

У разных комбинаций скрещивания нектарина качество проростков было разным. Так, у сорта Early Star зародыши развивались ненормально: увеличивались и атипически разрастались семядоли, которые впоследствии приобретали бурый цвет и отмирали. Развитие зародышей заканчивалось, когда корень достигал 1 редко 3 см.

У растений комбинации скрещивания 404-90 х 47-94 побеги достигали 0,5-1 см, они имели крупные деформированные листья.

Побеги сорта Нектаред 2 от свободного опыления достигали 3-5 см, были густо облиственными (более 10 шт), с листьями нормальной формы.

Таблица 3

Выход растений нектарина в зависимости от сроков введения в культуру *in vitro*, %

Сорт	1996 год		1998 год	
	Дата введения	Выход растений, %	Дата введения	Выход растений, %
Никитский 85 *	-	-	1.07	13,1
F <sub>1</sub> (Флаус х Фаворита Мореттини) *	29.07	36,5	2.07	15,4
Mayglo *	2.08	73,9	17.07	23,8
F <sub>1</sub> (Флаус х Фаворита Мореттини) х Рубиновый 4	-	-	31.07	55,6

\* - Свободное опыление

Растения межвидовых гибридов Нектамира 140-75 и Нектамира 545-85 от свободного опыления были нормально развитыми. Отмечено, что все адаптированные *in vivo* растения этих межвидовых гибридов имели листья нормальной формы, расположенные по побегу в строгой очередности.

Из проростков форм нектарина 18-94 и 29-94 от свободного опыления получены растения с высотой побега 4-6 см в основном с листьями нормальной формы и пропорциональных размеров. Встречались проростки с пучком листьев на верхушке побега, с деформированной (сморщенной) листовой пластинкой.

Проростки гибрида F<sub>1</sub> 169-81 (нектарин Говера х Гвардейский Желтомясый) от свободного опыления отличались дружным выровненным корнеобразованием у проростков в пробирках, а побеги - длиной 4-5 см и сближенными междоузлиями. Встречались растения с дважды-трижды рассеченными листьями.

У проростков нектарина N 12 V от свободного опыления при пересадке в почву часто отмирал главный побег, а затем из межсемядольной области вырастали новые, также встречались растения с деформированными листьями.

Проростки межвидовой гибридной формы Нектадиана 723-1-91 х (47-94) имели хорошо развитый побег с очередным расположением листьев нормальной формы. Корень одного из них имел вид сросшихся по длине двух корней. Это растение хорошо адаптировалось в почве.

Таким образом, выход проростков нектарина и их качество зависели от генотипа материнской формы и срока введения исходных эксплантов в культуру.

Все сорта нектарина, с которыми мы работали, по сроку созревания плодов относятся к ранней и ранне-средней группам [8]. Они созревают в I – II декадах июля - I декаде августа. При культивировании *in vitro* зародышей этих сортов, выяснилось, что количество получаемых проростков и растений зависит от срока их созревания в природе и поэтому мы разделили их на четыре класса по мере введения *in vitro*.

Зародыши из зрелых плодов Early Star от свободного опыления и (404-90) х (47-94), созревающие во 2 декаде июля, прорастали дольше других - 53-67 дней. Они были введены в эмбриокультуру 16.07 (табл. 5). Из них у зародышей сорта Early Star от свободного опыления растений не получено, а у гибридной комбинации скрещивания 404-90 х (47-94) получили всего 1 растение этого срока посадки, что составляет 5,3% (табл.4).

Зародыши межвидовых гибридов Нектамира 140-75 и Нектамира 545-85 нектарина 20-94, Изысканный 18-94 и Нектаред 2 от свободного опыления, взятые из плодов, созревших на 10-14 дней позже, начали прорастать в основном через 44 дня. Их вводили в эмбриокультуру 25.07. Из них получено 31,3% растений второго срока введения *in vitro*.

Менее зрелые зародыши нектарина 20-94 и F<sub>1</sub> 169-81, занимавшие 2/3 объема семени, прорастали на 42-56 день. Их вводили в эмбриокультуру 27.07. А зародыши нектарина N 12 V из незрелых плодов, которые созревают в 1 декаде августа, помещали в культуру *in vitro* 30.07. Зародыши прорастали 40 дней. В 3 группе получили 40,2 % растений.

Зародыши гибридной комбинации скрещивания Нектадиана 723-1-91 х 47-94 вводили в эмбриокультуру 16.08. из перезрелых плодов. Они прорастали 36 дней. Получили 100% проростков и 50% растений.

Следовательно, исходя из полученных результатов, можно заключить, что от срока созревания сортов зависят количество и качество получаемых проростков и растений нектарина, а также срок содержания таких зародышей в условиях пониженных положительных температур.



Таблица 4

## Выход проростков и растений нектарина

Срок введения in vitro	Комбинация скрещивания	Зародышей, шт.	Проростков, шт.	Количество адаптированных растений		
				шт.	(%)	% в группе
1	Early Star *	16	0	0	0	
	404-90 x (47-94)	3	2	1	33,3	
	<u>Всего:</u>	19	2	1		5,3
2	Нектамира 140-75 *	5	1	1	20	
	Нектамира 545-85 *	7	4	5	71,4	
	Нектарин 20-94 *	6	2	2	33,3	
	Изысканный 18-94 *	8	2	2	25	
	Нектаред- 2 *	6	0	0	0	
	<u>Всего:</u>	32	9	10		31,3
3	Нектарин 20-94 *	20	15	7	35	
	F1 169-81 (нектарин Говера x Гвардейский Желтомясый) *	26	18	17	65,4	
	Нектарин N 12 V *	86	36	29	33,7	
	<u>Всего:</u>	136	69	53		40,2
4	Нектадиана 723-1-91 x (47-94)	2	1	1	50	
	<u>Всего:</u>	2	1	1		50

\* - Свободное опыление

Наши исследования по раннеспелым сортам нектарина согласуются с литературными данными. Так, O.W. Davidson [10], выращивая зародыши персика разных сроков созревания, установил, что зародыши из плодов, созревающих до 20.07, редко прорастали в искусственной культуре. Зародыши, взятые из семян плодов, созревающих до 25.07, прорастали тоже слабо. Если же брались для культивирования зародыши из зрелых и незрелых плодов после 25.07, то они обычно прорастали хорошо.

В зависимости от природных условий года качество семян нектарина, вводимых в эмбриокультуру, различалось. Часто лучшей питательной средой для получения проростков и растений из зародышей была среда MS, иногда среда Уайта или Монье. Анализ динамики появления проростков показал, что к 1 октября основная часть проростков (77,9%) по силе развития была готова к высадке в почву, это составило 57,3% от количества всех зародышей в эксперименте.

Органогенез у зародышей алычи семядольной стадии проходил менее интенсивно. Полностью сформированные зародыши алычи, занимавшие полный объем семени, развивались хуже, чем зародыши нектарина. Проростки имели слабо развитую корневую систему т.к. на главном корне развивался каллус, который препятствовал росту и развитию проростков. Зародыши алычи гибридной комбинации скрещивания Кизилташская Ранняя x Вилора лучше развивались на среде MS, по сравнению со средой Монье. Так, на среде Монье хуже развивались побеги, корни достигали 1,5 – 5 см, у большинства зародышей только приоткрывались семядоли.

Таблица 5

## Эмбриокультура нектарина и алычи ранозревающих сортов и гибридов

Исходная форма	Дата введения	Период низкотемпературной обработки	Количество (шт.)			
			плодов	семян	проростков	растений
Субхи Ранняя *	11.06.93	58	47	47	10	0
Курортная *	11.06.93	58	48	48	5	0
Mayglo *	29.07.96	51	69	93	69	13
Mayglo *	07.08.96	51	46	68	45	4
Рубиновый 4 *	10.08.96	60	53	59	46	6
F1(Флаус х Фаворита Мореттини) *	26.07.96	51	70	79	30	5
Вилора х Кизилташская Ранняя *	8.06.96	60	16	16	0	0
Вилора *	8.06.96	60	7	7	3	0
Субхи Ранняя *	8.06.96	60	6	6	1	0
Курортная *	8.06.96	60	5	5	0	0
Кизилташская Ранняя *	8.06.96	60	13	13	7	1
Кизилташская Ранняя х Вилора	8.06.96	60	33	33	7	1
Super Crimson Gold **	28.07.97	86	24	28	14	0
Crimson Gold *	28.07.97	52	22	26	18	3
Никитский 85 *	01.07.98	50-60	46	47	11	0
F1(Флаус х Фаворита Мореттини) *	02.07.98	50-60	26	26	6	0
Mayglo *	14.07.98	60	42	48	13	3
F1(Флаус х Фаворита Мореттини) х Рубиновый 4	31.07.98	46	10	9	7	4
Mayglo *	12.07.99	51	54	64	53	34
Armcing Precoce *	12.07.99	50	16	19	13	3
Super Crimson Gold *	13.07.99	74	11	13	4	0
404-90 *	14.07.99	49	24	28	25	11
Рубиновый 4 х Early Star	04.08.99	50	2	2	0	0
Хемус*	28.06.00	54	4	2	0	0
Mayglo *	28.06.00	48-54	68	74	46	27
Mayred х Mayglo	03.07.00	49	45	33	29	12
Early Star *	16.07.01	53-67	17	16	0	0
(404-90) х (47-94)	16.07.01	53-67	3	3	2	1
Нектамира 140-75 *	25.07.01	44	9	5	1	1
Нектамира 545-85 *	25.07.01	44	10	7	4	5
20-94 *	25.07.01	42-56	5	6	2	2
20-94 *	27.07.01	42-56	16	20	15	7
Изысканный 18-94 *	05.07.01	42-56	9	8	2	2
F1 169-81 (Нектарин Говера х Гвардейский Желтомясый)	27.07.01	42-56	26	26	18	17
Нектарин 12 V *	30.07.01	39	55	86	36	29
Нектаред 2 *	25.07.01	44	11	6	0	0
Нектадиана 723-1-91 х (47-94)	16.08.01	36-75	2	2	1	1

\* \* - Самоопыление

На среде МС с добавлением 6-БАП 1,2 мг/л и 2,4-Д 0,2 мг/л растения росли лучше, корни достигали 1,5 - 9 см, а побеги 1,5 см с 8-9 сильно разросшимися листьями.

Сравнительный анализ роста гибридных и негибридных проростков показал значительное преимущество гибридов. У них побеги были вдвое выше, чем у проростков исходных материнских сортов. Адвентивное побегообразование отмечено у зародышей родительских сортов Кизилташская Ранняя и Вилора от свободного опыления, чего не наблюдали у зародышей гибридной комбинации скрещивания.

Адаптацию растений к почвенным условиям проводили через 3-4 недели культивирования *in vitro* стратифицированных зародышей. Успех адаптации зависел от стабильности условий выращивания.

При изучении морфогенеза зародышей *in vitro* проводили эксперименты с наиболее ранними стадиями эмбриогенеза на примере нектарина 41-9-3.

В культуру *in vitro* вводили семяпочки и завязи на три варианта питательной среды МС с добавками фитогормонов. Исследования показали различную реакцию эксплантов на органические добавки. Так, при культивировании завязей в течение первых 10 суток наблюдали увеличение их, в среднем на 27,5 – 37,5%. В последующие 10 дней – еще на 41,3 – 75 %, что в среднем за 20 суток составило 65,5 % на питательной среде с ГК 0,7 мг/л и 75% - на среде с добавлением аденина 1,5 мг/л, кинетина 0,1 мг/л, 6-БАП 0,7 мг/л и ГК 0,7 мг/л (см. рис. 2). Экспланты только последнего варианта среды через 30 дней культивирования достигли 87,5% прироста к первоначальному объему. При этом наблюдали естественное постепенное усыхание столбика у пестиков и изменение окраски эксплантов. У нормально развивающихся эксплантов окраска была зеленой и темно-зеленой, у эксплантов с замедленным развитием – светло-зеленого, желтого и бурого цвета. Отмечен положительный синергизм аденина, кинетина, 6-БАП и ГК на завязи нектарина ранних фаз развития.

Изолированные семяпочки развивались следующим образом. В первые 7 дней культивирования *in vitro* они увеличивались очень незначительно и их покровы, как правило, приобретали бурый цвет. Через 14 дней культивирования наблюдали раскрытие бурых покровов и появление из них прозрачных глобул, размер которых к этому времени в 1,5 раза превышал первоначальные размеры семяпочек.

Затем мы дополнили наши исследования развития завязей и семяпочек на примере гибридной комбинации Хемус x Мейгло. Проводили сравнительное цитоэмбриологическое изучение процессов, протекающих в них в это время *in vitro* и в природе. Год проведения эксперимента отличался холодной весной. Сроки цветения у многих сортов нектарина и других косточковых культур в среднем запоздали на 2 недели. Среднесуточная температура в 10-дневный период после опыления равнялась +6,2°C и за последующие еще 10 дней +11,9 °С. Для наших культур эти показатели на 4-8 °С ниже оптимальной среднесуточной температуры, необходимой для нормального прорастания пыльцы и оплодотворения в первые 10 суток после опыления. Такие погодные условия не способствовали нормальному прохождению процессов опыления и оплодотворения, развитию зародыша, которые находятся в тесной зависимости от воздействия внешних климатических условий. Различные неблагоприятные факторы нарушают нормальный ход всех эмбриологических процессов. В частности, при низкой температуре воздуха нарушается нормальность процессов оплодотворения, развития эндосперма и зародыша.

На наших цитоэмбриологических препаратах было отмечено общее замедление протекания процесса оплодотворения, как в природе, так и *in vitro*.

Отмечено, что на питательной среде  $\frac{1}{2}$  MS с сахарозой у завязей, находящихся на ранних этапах развития (введенных *in vitro* через 7 дней после опыления) и содержащихся 5-16 дней в культуре *in vitro*, наблюдали рост и изменение окраски покровов от зеленого цвета до более светлого. Через 5 дней культивирования *in vitro* завязи увеличились на 20%, а через 16 дней – на 33% от первоначального размера.

В природе на цитоэмбриологических препаратах в этот период наблюдали зрелый зародышевый мешок, а *in vitro* – развитие интегументов и нуцеллуса.

В зависимости от сорта и погодных условий, согласно данным Л.М. Смыченко [9], у персика созревание зародышевого мешка достигает окончательного развития на 2-5 сутки с начала цветения, а оплодотворение проходит через 5-8 (до 14 суток) после опыления. Оплодотворяется у персика только 1 семяпочка, вторая отстает в развитии еще до начала цветения и ко времени оплодотворения более жизнеспособной семяпочки имеет признаки дегенерации. После оплодотворения идет интенсивное разрастание завязи и семяпочки. Дифференциация зародыша начинается через 40-45 суток после оплодотворения, а полного развития зародыш достигает примерно через 70 суток после оплодотворения.

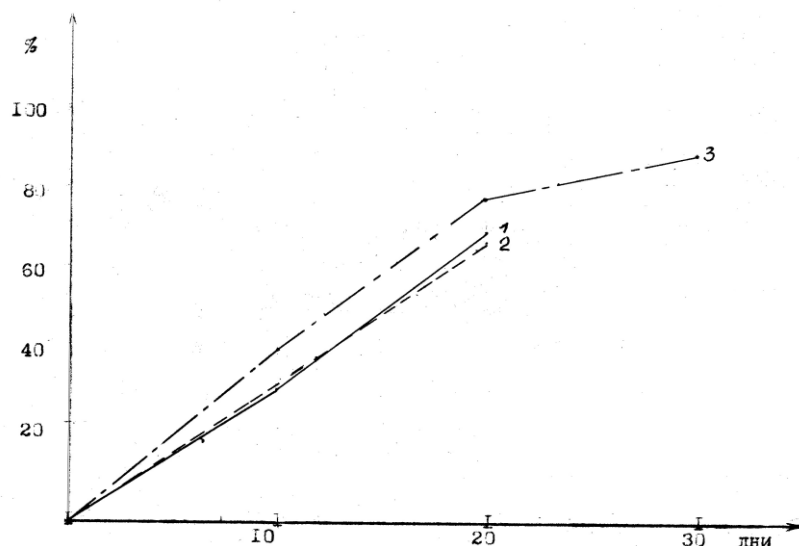


Рис. 2. Динамика роста завязей нектарина 41-9-3 *in vitro*, %: 1 – питательная среда с ГК<sub>3</sub> 0,7 мг/л, 2 – с аденином 1,5 мг/л, кинетином 0,1 мг/л, ГК<sub>3</sub> 0,7 мг/л, 3 – с аденином 1,5 мг/л, кинетином 0,1 мг/л, ГК<sub>3</sub> 0,7 мг/л, 6-БАП 0,7 мг/л

У алычи на 6-7 сутки с момента раскрытия цветка и опыления зародышевый мешок был полностью готов к оплодотворению. Процесс оплодотворения зарегистрирован на 8-10 сутки после опыления, в зависимости от среднесуточной температуры в период от опыления до оплодотворения [2].

По нашим наблюдениям у некоторых сортов нектарина, в отличие от персика, часто оплодотворяются две семяпочки, семена достигают полного развития или одно из них бывает меньшего размера.

При введении в культуру *in vitro* завязей сроком 12 дней после опыления отмечено разрастание нижней части тканей завязей с образованием меристематических зон. Семяпочки по скорости роста опережали рост тканей завязи таким образом, что

семяпочки выдвигались из них. Эти завязи находились *in vitro* от 8 до 22 дней. За этот период увеличение их размеров составило 50 – 66,7% к первоначальному размеру.

У персика в природных условиях в этот период уже начинают образовываться клеточные перегородки в эндосперме [9]. Образование их начинается с микропиллярного конца через 30 – 35 суток после оплодотворения.

При культивировании завязей и семяпочек нектарина более поздних сроков развития (22 – 35 дней после опыления) через 4 – 13 дней культивирования мы наблюдали, что их покровы приобретали бурый цвет, а нуцеллус появлялся через трещины в интегументах. Цитологический анализ показал, что это происходит за счет увеличения размера клеток нуцеллуса, тогда как интегументы становились бурыми и жесткими. Вероятно, что оплодотворение произошло приблизительно на 22–26 сутки, поскольку в этот период в природе наблюдали образование глобулярного зародыша, а в условиях *in vitro* – в основном дегенерацию тканей семяпочки и элементов зародышевого мешка, т.е. дегенерацию проэмбрио и ядер эндосперма.

У персика в природе [9] в этот период клетки проэмбрио интенсивно делятся незадолго до образования клеточного эндосперма. Дифференциация зародыша начинается через 40 – 45 суток после оплодотворения.

При введении семяпочек *in vitro* на 44 день после опыления и культивирования их в течение 14 – 28 дней у всех эксплантов отмечено появление фенольных соединений на питательной среде. Размер эксплантов увеличивался на 42,9 – 50%.

На наших цитоэмбриологических препаратах *in vivo* наблюдали развитие зародыша семядольной стадии с дифференцирующейся в нем проводящей системой. На препаратах *in vitro* в этот срок наблюдали приближение пыльцевой трубки со спермием к ядру яйцеклетки, т.е. процесс оплодотворения очень затянулся.

Таким образом, наблюдаемое в нашем случае сильное замедление процесса оплодотворения в природе (на 22 – 26-й день после опыления) в конечном итоге может быть причиной низкой завязываемости семян у данной гибридной комбинации.

Эти данные подтверждаются результатами следующего 2003 года, когда из-за неблагоприятных для цветения и опыления погодных условий опыление и оплодотворение у всех наших гибридных комбинаций оказалось неполноценным. Семена у них были недоразвитыми или отсутствовали. У комбинации скрещивания *Maured* x *Mauglo* развились всего 9 плодов, в семенах которых не было зародышей. А у комбинации *Хемус* x *Mauglo* из 53 развившихся плодов только один содержал семя, которое было недоразвито. У остальных плодов не сформировались даже косточки и вместо них наблюдали группы каменистых клеток. Лишь на дереве, находившемся в теплице, у нектарина *Mauglo* от самоопыления развились 9 плодов. Их зародыши были нормально сформированы, но маленькие. Из них получены адаптированные растения.

### Выводы

Таким образом, в результате исследования возможностей и особенностей развития зародышей нектарина и алычи разных стадий эмбриогенеза в условиях *in vitro* установлены пути морфогенеза из эксплантов разного возраста: каллусогенез, эмбриогенез, органогенез. Выявлено, что пути морфогенеза у зародышей нектарина и алычи *in vitro* определяются составом фитогормонов и их соотношением в питательной среде.

Экспериментальным путем определены оптимальные стадии введения зародышей нектарина и алычи в культуру *in vitro* для получения каллуса или жизнеспособных растений. Так, развитие зародышей нектарина ранних стадий эмбриогенеза со сформированными семядолями длиной 1,5-3 мм шло по пути каллусогенеза. Интенсивность роста и качество каллуса зависели от генотипа и состава питательной среды и были

лучше у сорта Кримсон Глод на питательной среде МС с добавлением 6-БАП 0,2 мг/л и 2,4-Д 1 мг/л.

При помещении в культуру более развитых зародышей нектарина и алычи семядольной стадии развитие шло по пути эмбриогенеза, а затем останавливалось, или шло по пути органогенеза.

Развитие морфологически зрелых зародышей, взятых из окрашенных неспелых плодов, зависело от степени физиологической зрелости зародышей. Потенциальные возможности к дальнейшему развитию зародышей нектарина и алычи, изолированных в различные сроки семядольной стадии и процент получения адаптированных растений был тем выше, чем больший объем семени занимал зародыш и чем более зрелым он был.

Установленные закономерности развития зародышей нектарина и алычи в культуре *in vitro* главным образом определялись возможностью генотипа материнских форм изучаемых культур. У сортов и гибридов нектарина раннего срока созревания это особенно хорошо прослеживалось. Из зародышей очень ранних сортов (Хемус, Маугед от свободного опыления) и гибридных комбинаций (404-90) x (47-94) и других, растений не получали или они были единичными (5.3%). Из зародышей более позднего срока созревания семядольной стадии развития выход гибридных растений был выше и достигал 31-52%.

В результате изучения развития завязей и семяпочек нектарина 41-9-3 и гибридной комбинации скрещивания Хемус x Мейгло в неблагоприятных погодных условиях в период опыления (2002-2003 гг.) установлено замедленное протекание всех эмбриологических процессов в женской генеративной сфере в природных условиях и в культуре *in vitro*.

### Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений.- М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Елманов С.И., Шоферистова Е.Г. Цитозембриологическое исследование абрикоса, алычи и их гибридов // Труды Никит. ботан. сада. - 1970. - Т.46.- С.159-172.
3. Еремин Г.В. Алыча. – М.: Агропромиздат, 1989. – 113 с.
4. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*. Метод. реком.- М.: Наука, 1974.-62 с.
5. Костина К.Ф. Культурная алыча Крыма // Сад и огород. - 1946. - N8/9. - С. 33-37.
6. Костина К.Ф. Селекция алычи // Бюл. Ботан. Сада. М.:Наука, 1966. - Вып.62. - С.20-23.
7. Костина К.Ф. Алыча (*Prunus cerasifera* Ehrh) // Каталог коллекции сортов плодовых культур Государственного Никитского ботанического сада (Косточковые породы).- Симферополь, 1970. – С. 31-37.
8. Рябов И.Н., Гуф З.В. Персик (*Persica vulgaris* Mill) // Каталог коллекции сортов плодовых культур Государственного Никитского ботанического сада (Косточковые породы).- Симферополь, 1970. – С. 47-75.
9. Смыченко Л.М. Особенности цветения и эмбриологии раносозревающего персика в связи с его селекцией в полесье УССР: Автореф. дис. канд. биол. наук - Киев, 1972.- 23 с.
10. Davidson O.W. The germination of «non-viable» peach seeds // Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 1933, - V.30. – P.129-132.

11. Lane W.D., Cossio F. Adventitious shoots from cotyledons of immature cherry and apricot embryos // Canadian J. of Plant Sci., 1986. - № 4, V.66. - P. 953-959.

**Embryoculture of cherr-plum and nectarine in the connection with the aims of selection**

Saenko I. N.

The results of many-years researches on embryoculture of early ripening varieties and forms of nectarines and cherry-plums have been given. The ways of morphogenesis of ovary and ovule and also ripened and not ripened, occupied  $1/3$ ,  $1/2$  or the whole volume of the seed have been studied in vitro.

The adapted plants of nectarines and cherry-plum growing in the field condition have been obtained.