

## ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ПОЛУЧЕНИИ СЕЛЕКЦИОННЫХ ФОРМ ПЕРСИКА (*PRUNUS PERSICA* (L.) BATSCH) И АБРИКОСА (*PRUNUS ARMENIACA* L.)

Н.П. ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО;

О.В. МИТРОФАНОВА, доктор биологических наук;

А.В. СМЫКОВ, кандидат сельскохозяйственных наук;

В.М. ГОРИНА, кандидат сельскохозяйственных наук

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр УААН

Одним из важнейших направлений в селекции косточковых плодовых культур является создание генетического разнообразия и получение новых форм растений. В связи с возрастающей потребностью в сортах растений с широким спектром созревания, высокой продуктивностью и другими хозяйственно ценными признаками в Никитском ботаническом саду проводятся работы по селекции косточковых плодовых культур. При этом большое внимание уделяется созданию селекционных форм с ранним сроком созревания плодов. Одним из биотехнологических приемов, используемых в селекции, является эмбриокультура. Известно, что получению новых форм часто препятствует явление несовместимости исходных генотипов при гибридизации, что в большинстве случаев приводит к формированию семян с неполноценными зародышами, которые достигают лишь начальных этапов развития, не позволяющих получить взрослые растения при традиционных приемах выращивания [3, 4]. Большое значение придается всестороннему изучению морфогенетических процессов, происходящих в тканях таких зародышей и получению из них полноценных растений в условиях *in vitro*. Несмотря на большое число публикаций по эмбриокультуре и микроразмножению растений *in vitro*, для ряда косточковых плодовых культур, таких как персик и абрикос, они по-прежнему остаются проблемой и требуют дополнительных исследований. Наиболее перспективным направлением повышения всхожести семян, получения жизнеспособных растений и генетического разнообразия является применение биотехнологических методов и разработка новых методов селекции *in vitro*, что позволяет не только ускорять процесс получения раннеспелых форм, но и размножать новые высокоурожайные сорта и перспективные формы [3, 5, 7, 8]

Целью настоящего исследования было получение генетического разнообразия и новых селекционных форм персика и абрикоса с использованием эмбриокультуры и микроразмножения *in vitro*.

### Материалы и методы

Объектами исследования служили развитые и недоразвитые гибридные зародыши персика (*Prunus persica* (L.) Batsch) и абрикоса (*Prunus armeniaca* L.) и проростки, полученные в процессе культивирования *in vitro* зародышей этих культур.

В опытах использовали гибридные зародыши персика шести комбинаций скрещивания ('Армголд' х 'Фаворита Мореттини', 'Спринголд' х 'Фаворита Мореттини', 'Эрли Ред' х 'Фаворита Мореттини', 'Фаворита Мореттини' х 'Армголд', 'Прекрасный' х 'Крымский Фейерверк', 'Чехов' х 'Крымский Фейерверк') и двух сортов (Пламенный и Санхейвен) от свободного опыления, а также абрикоса сортов Дионис, Наследник, Салют и Эффект от свободного опыления.

Основным методом исследований являлся метод культуры зародышей *in vitro*. Получение стерильной культуры осуществляли по общепринятой методике [1, 2, 6] и с применением методов, разработанных в отделе биотехнологии растений НБС-ННЦ [6]. Все опыты осуществляли с соблюдением условий асептики. Стерилизацию косточек абрикоса проводили путем погружения на 1-2 секунды в 90-95%-ный этанол и последующего обжига в пламени спиртовки. Зародыши извлекали путем раскрытия косточек с помощью специально сконструированного прибора для разрушения каменистых околоплодников [2]. Семенные покровы и неизрасходованные зародышами ткани (нуцеллус и эндосперм) удаляли в

стерильных условиях, а затем зародыши помещали в культуральные сосуды. При изучении морфогенетических потенциалов персика и абрикоса в условиях *in vitro* использовали модифицированные нами питательные среды Монье [10] (M1, M2), Мурасиге и Скуга [11] (МС1, МС2), В5 [9], QL [12], Уайта [13]. Для инициации развития эксплантов и получения множественных адвентивных побегов в питательные среды вводили фитогормоны цитокининового (БАП, кинетин) и ауксинового (НУК, ИМК) типов действия, добавляя гибберелловую кислоту (ГК), L-глутамин, глицин, гидролизат казеина.

Первоначально культуральные сосуды с зародышами помещали в холодильную камеру с пониженными положительными температурами ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ) и отсутствием освещения. Через 2-3 месяца их выставляли в культуральную комнату с освещенностью 2-3 клк, среднесуточной температурой  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , фотопериодом 16 часов и относительной влажностью воздуха 70-80%. Субкультивирование эксплантов осуществляли каждые 2-3 недели. Полученный в условиях *in vitro* растительный материал оценивали по качественным и количественным показателям.

### Результаты и обсуждение

Первоначально опыты были направлены на выявление оптимальной питательной среды для культивирования зародышей персика и абрикоса. Испытывали различные составы питательных сред, наиболее часто применяемых в эмбриокультуре: Монье, Мурасиге и Скуга (МС), Уайта. Лучшие результаты для развитых зародышей персика и абрикоса получены на безгормональной среде Монье, дополненной 2,5% сахарозы, 0,7% агара и 0,04% гидролизата казеина. При культивировании недоразвитых зародышей на этой среде формировались единичные неполноценные проростки. На питательных средах Монье и МС, содержащих кинетин в концентрации 0,93-4,60 мкМ, ГК – 0,29-2,89 мкМ, L-глутамин – 34,22-68,44 мкМ, НУК – 0,027 мкМ, гидролизат казеина – 0,4%, наблюдали различные пути реализации морфогенетического потенциала. Так, на питательной среде МС отмечали образование каллуса, чаще всего неморфогенного. После 6-7 пассажей на среде с добавками регуляторов роста в различных сочетаниях и концентрациях вызвать морфогенетические процессы в таком каллусе не удалось. Зародыши персика и абрикоса, помещенные на модифицированную питательную среду Монье, более активно прорастали и формировали полноценные проростки. При этом генотип и размер первичного экспланта оказывали существенное влияние на регенерацию растений. Так, при культивировании зиготических зародышей длиной до 0,3 см наблюдали образование единичных проростков, однако полноценных растений получено не было. Лучшее развитие проростков отмечено из зародышей размером 0,8-2,0 см.

В опытах по получению новых селекционных форм персика были использованы зародыши трех комбинаций скрещивания, в которых одной из родительских форм был сорт Фаворита Мореттини или Крымский Фейерверк с ранним сроком созревания плодов. При введении эксплантов персика в условия *in vitro* приблизительно 50% зародышей были на стадии сердечко или торпедо длиной 0,5-1,0 мм. Известно, что у косточковых плодовых культур отмечена закономерность – чем менее развит зародыш, тем труднее получить из него полноценный проросток, а тем более взрослое растение [3, 6]. Кроме того, раносозревающим сортам свойственно растрескивание тканей мезокарпия и эндокарпия. Зародыши, вычлененные из таких плодов, при введении в условия *in vitro* часто погибают от грибной и бактериальной инфекции. Недоразвитые зародыши персика были спассированы на модифицированную питательную среду Монье с добавлением кинетина, L-глутамина и увеличенным содержанием хелата железа и сахарозы. У зародышей в комбинации скрещивания 'Фаворита Мореттини' x 'Армголд' сформировавшиеся растеньица были получены в условиях *in vitro* из зародышей длиной от 6 до 13 мм. Результаты культивирования недоразвитых зародышей персика этой комбинации скрещивания представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Влияние состава питательных сред на развитие недоразвитых зародышей персика гибрида Фаворита Мореттини x Армголд**

Питательная среда	К-во полученных проростков, %	Средняя длина, мм	
		побега	корня
Монье (контроль)	57,8	0,78±0,08	4,1±0,2
Монье + кинетин 0,93 мкМ НУК 0,027 мкМ	61,4	1,18±0,06	4,7±0,4
Монье + кинетин 1,86 мкМ НУК 0,027 мкМ	59,5	0,89±0,09	4,2±0,3
Монье + кинетин 0,93 мкМ НУК 0,054 мкМ	78,5	2,06±0,07	6,8±0,6
МС + кинетин 0,93 мкМ НУК 0,027 мкМ	55,4	1,06±0,07	4,0±0,2
МС + кинетин 1,86 мкМ НУК 0,027 мкМ	52,2	0,72±0,08	3,8±0,3
МС + кинетин 0,93 мкМ НУК 0,054 мкМ	58,8	1,77±0,06	5,2±0,4
Уайта + кинетин 0,93 мкМ НУК 0,054 мкМ	22,0	0,42±0,03	1,1±0,2
Уайта + кинетин 1,86 мкМ НУК 0,027 мкМ	21,8	0,33±0,04	1,0±0,4
Уайта + кинетин 0,93 мкМ НУК 0,027 мкМ	27,6	0,90±0,06	2,8±0,3

Наблюдения показали, что лучший рост был у проростков, полученных из зародышей комбинации скрещивания 'Чехов' x 'Крымский Фейерверк', 'Прекрасный' x 'Крымский Фейерверк' и 'Эрли Ред' x 'Фаворита Мореттини' (табл. 2). В этом случае у проростков развивались главные и боковые корни, наблюдалось нормальное развитие побега и листьев. Начало развития проростков отмечено у всех культур через 2-2,5 месяца культивирования в условиях отсутствия света и пониженной положительной температуры (4±1 °С).

Таблица 2

**Развитие гибридных зародышей персика на модифицированной питательной среде Монье**

Генотип	Количество зародышей, %	
	проросших, но не сформировавших растения	сформировавших растения
Армголд x Фаворита Мореттини	26,2±3,1	9,8±0,8
Спринголд x Фаворита Мореттини	14,2±2,4	36,2±4,2
Эрли Ред x Фаворита Мореттини	29,9±3,9	46,7±4,7
Прекрасный x Крымский Фейерверк	10,1±2,4	68,7±3,8
Чехов x Крымский Фейерверк	9,4±1,1	79,8±3,7

Так, через 2,5 месяца культивирования в темноте при низких положительных температурах развитие зародышей в проростки было только у сорта Санхейвен. Средняя длина главного корня у сортов Санхейвен и Пламенный составила 0,97±0,4 и 1,01±0,7 см,

побега –  $0,49 \pm 0,2$  и  $0,91 \pm 0,7$  см, соответственно. Однако через 4,5 месяца культивирования лучшее развитие наблюдали у зародышей в комбинации скрещивания ‘Прекрасный’ х ‘Крымский Фейерверк’ и сорта Пламенный от свободного опыления (рис. 1, а, б). Проростки сорта Пламенный характеризовались формированием большого количества боковых корней (до 19 шт.) длиной от 0,5 до 8,1 см. При развитии зародыши персика сорта Санхейвен формировали корни коричневого цвета, что практически делает невозможной адаптацию *in vivo*. Экспланты генотипов персика, сформировавших неполноценные проростки, были расчерченкованы и помещены на модифицированную среду В5 для клонального микроразмножения с целью получения множественных адвентивных побегов и дальнейшего укоренения.

Для получения новых селекционных форм абрикоса в условия *in vitro* были введены зародыши, полученные от свободного опыления сортов Дионис, Наследник, Салют и Эффект. При культивировании зародышей абрикоса на средах Монье и МС, содержащих кинетин в концентрации 0,93-4,60 мкМ, ГК – 0,29-2,89 мкМ, L-глутамин – 34,22-68,44 мкМ, гидролизат казеина – 0,4%, наблюдали различные пути реализации морфогенетического потенциала. Зародыши абрикоса, помещенные на питательную среду Монье в нашей модификации, более активно прорастали и формировали полноценные проростки. Лучшее развитие проростков отмечено из зародышей размером 0,8-2,0 см. У сортов абрикоса Дионис, Наследник, Салют и Эффект полноценные проростки развивались спустя 2-2,5 месяца культивирования на питательной среде Монье (модификация М1). При этом установлено, что более высокими регенерационными способностями обладали зародыши сортов Дионис и Эффект, у которых через 2 месяца культивирования количество полученных проростков составило 92,4% и 72,2% соответственно. Результаты развития зародышей абрикоса на различных питательных средах приведены на рисунке 2.

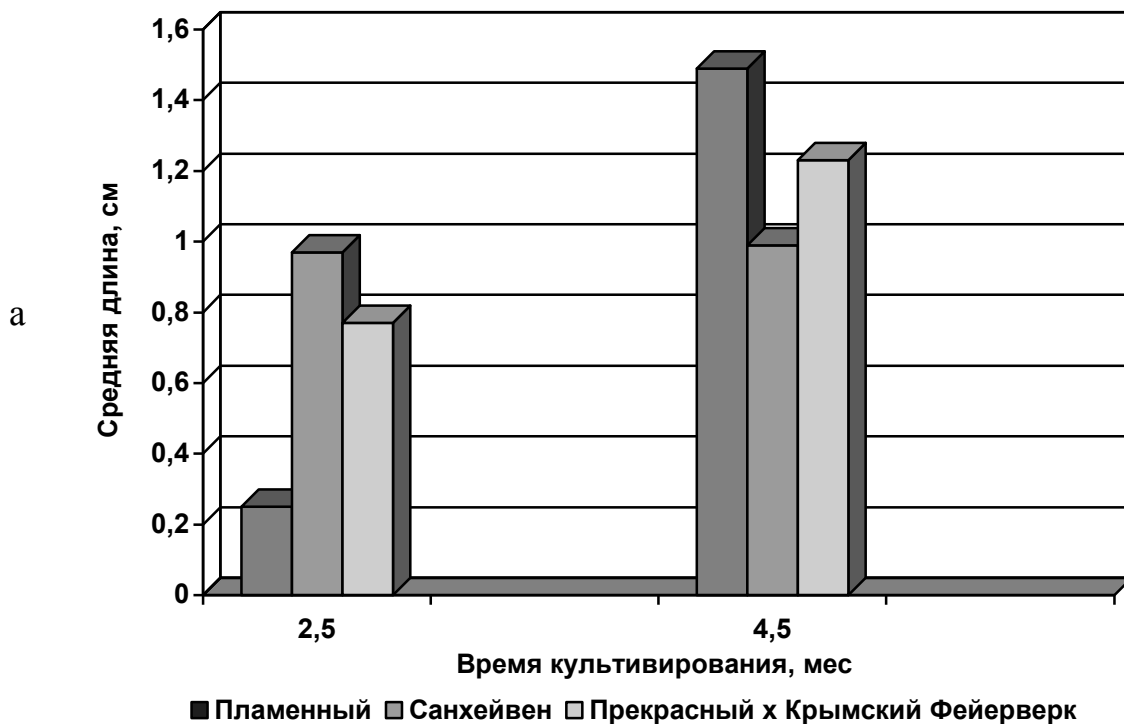




Рис. 1. Развитие корня (а) и побега (б) из зародышей персика сортов Пламенный, Санхейвен и гибрида Прекрасный x Крымский Фейерверк на питательной среде Монье в условиях *in vitro*

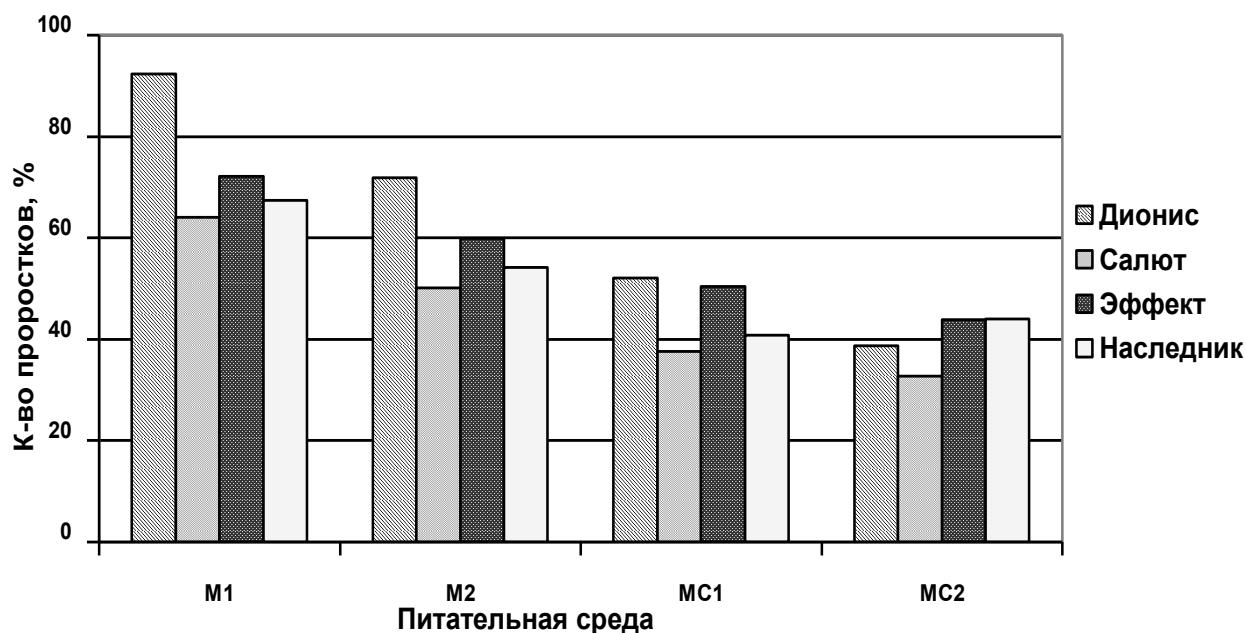


Рис. 2. Развитие проростков из зародышей 4-х сортов абрикоса через 2,5 месяца культивирования на питательных средах: M1 – среда Монье + 0,93 мкМ кинетина + 0,027 мкМ НУК + 0,29 мкМ ГК; M2 – среда Монье + 1,86 мкМ кинетина + 0,054 мкМ НУК + 0,29 мкМ ГК; MC1 – среда MC + 0,93 мкМ кинетина + 0,027 мкМ НУК + 0,29 мкМ ГК; MC2 – среда MC + 1,86 мкМ кинетина + 0,054 мкМ НУК + 0,29 мкМ ГК

В ряде случаев (30-52%) при развитии зародышей сортов Салют и Эффект было отмечено формирование слабо развитых проростков, что выражалось в отмирании апикальной части и недоразвитии корневой системы. Чтобы сохранить такой растительный материал, нами был использован способ микрочеренкования. Для получения множественных

адвентивных почек и побегов неполноценные проростки микрочеренковали, и сегменты с 2-3 междоузлиями помещали на питательные среды В5 и QL, содержащие различные сочетания и концентрации БАП, НУК и ИМК (рис. 3).



Рис. 3. Образование адвентивных микропобегов абрикоса сорта Эффект на модифицированной питательной среде QL

Через 5-6 недель на питательной среде В5, дополненной БАП в концентрации 0,44-22,20 мкМ, наблюдали образование адвентивных почек и развитие микропобегов. Однако дальнейшее субкультивирование на этой питательной среде не способствовало регенерации множественных побегов. Данные, приведенные в таблице 3, показывают, что активная регенерация микропобегов происходила на модифицированной питательной среде QL, содержащей 2,22-3,33 мкМ БАП и 0,054 мкМ НУК, на которой спустя 4-6 недель микропобеги достигали длины 1,5-2,5 см.

Для получения полноценных регенерантов после этапа собственно микроразмножения микропобеги помещали на среды с веществом ауксинового типа действия. Активное образование корней в основании микропобегов отмечали на

питательной среде, содержащей  $\frac{1}{2}$  состава макро- и микросолей по прописи МС, дополненной 0,049-1,23 мкМ ИМК. Увеличение концентрации ИМК способствовало обильному каллусообразованию, что делало практически невозможной адаптацию регенерантов *in vivo*.

Таблица 3

**Влияние различных концентраций БАП и НУК на регенерацию микропобегов 4-х сортов абрикоса**

Питательная среда	Количество образовавшихся микропобегов, шт./эксплант			
	Дионис	Наследник	Салют	Эффект
В5 (0,44 мкМ БАП+0,049 мкМ ИМК)	1,7±0,8	1,5±0,3	1,6±0,8	1,7±0,1
В5 (2,22 мкМ БАП+0,049 мкМ ИМК)	5,4±0,7	3,7±0,6	4,1±0,7	3,1±0,2
В5 (3,33 мкМ БАП+0,049 мкМ ИМК)	4,2±0,6	2,9±0,4	3,1±0,4	2,1±0,4
QL (0,44 мкМ БАП+0,054 мкМ НУК)	3,8±0,5	2,1±0,6	1,8±0,5	2,7±0,4
QL (2,22 мкМ БАП+0,054 мкМ НУК)	10,2±0,9	6,9±0,8	7,2±0,6	8,0±0,6
QL (3,33 мкМ БАП+0,054 мкМ НУК)	7,4±0,7	6,0±0,6	6,3±0,4	6,1±0,7

Через 4-5 месяцев культивирования миниатюрные растеньица высаживали в стерильную почвенную смесь. Проведенные испытания по определению влияния ряда почвенных субстратов на адаптацию *in vivo* растений, выращенных *in vitro*, показал, что все составленные смеси не получили преимущества перед смесью почва:песок:торф в объемном соотношении 3:1:1.

Таким образом, использование биотехнологических методов открывает большие перспективы по получению новых селекционных форм растений персика и абрикоса.

**Список литературы**

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 270 с.
2. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*. – М.: ВАСХНИЛ, 1974. – 60 с.

3. Здруйковская-Рихтер А.И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений. – Ялта: Крым-Фарм-Трейддинг, 2003. – 368 с.
4. Лесникова-Седошенко Н.П., Митрофанова О.В. Особенности морфогенеза в культуре органов и тканей абрикоса (*Prunus armeniaca* L.) // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2006. – Вып. 92. – С. 12-15.
5. Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Ходаков Г.В. Биотехнология в селекции и оздоровлении косточковых плодовых и субтропических культур // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. праць Укр. т-ва генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова / За ред. М.В. Роїка. – Київ: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 619-624.
6. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Труды Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 189-199.
7. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. – М.: Агропромиздат, 1990. – 384 с.
8. Burgos L., Ledbetter C.A. Improved efficiency in apricot breeding: Effects of embryo development and nutrient media on *in vitro* germination and seedling establishment // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1993. – Vol. 35, N 3. – P. 217-222.
9. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and deletion of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – Vol. 46, N 5. – P. 417-421.
10. Monnier M. Croissance et developpement des embryons globulaires de *Capsella Bursa-pastoris* cultivés *in vitro* dans un milieu a la base d'une nouvelle solution mineral // Bull. Soc. Bot. France, Memoires, Coll. Morphologie. – 1973. – P. 179-194.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473-497.
12. Quoirin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus* // Acta Hort. – 1977. – Vol. 78. – P. 437-442.
13. White P.R. Handbook of plant tissue culture. – Jaques Cattel Press, 1943. – Vol. 4. – P. 791-794.

**Using of biotechnology methods for obtaining of peach (*Prunus persica* (L.) Batch) and apricot (*Prunus armeniaca* L.) selection forms**

Lesnikova-Sedoshenko N.P., Mitrofanova O.V., Smykov A.V., Gorina V.M.

The biotechnological methods of obtaining of peach and apricot new selection forms for acceleration of breeding process and propagation have been represented.