культур / Под ред. Е.Н. Седова, Т.П. Огольцовой. – Орел: ВНИИСПК, 1999. – 608 с.

7. Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур / Под ред. Е.Н. Седова. – Орел: ВНИИСПК, 1995. – 503 с.

8. Рябов И.Н. Сортоизучение и первичное сортоиспытание косточковых плодовых культур в Государственном Никитском ботаническом саду // Сотроизучение косточковых плодовых культур на юге СССР. – М.: Колос, 1969. – Т. XLI. – С. 5-83.

9. Смыков В.К. Интенсификация селекции и ускорение внедрения новых сортов плодовых культур // Труды Никит. ботан. сада. – Ялта, 1989. – Т. 107. – С. 6-15.

10. Смыков В.К., Смыков А.В. Мобилизация исходного материала для селекции плодовых культур // Труды Никит. ботан. сада. – Ялта, 2004. – Т. 122. – С. 6-8.

11. Список сортов растений, занесенных в Государственный реестр, пригодных для распространения в Украине и рекомендованных для выращивания в Автономной Республике Крым на 2008-2009 годы. – Симферополь, 2008. – 32 с.

# МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ ЧЕРЕШНИ (*PRUNUS AVIUM* L.) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Н.В. КОРЗИНА
Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

## Введение

Начало изучению изолированных органов и тканей черешни (*Prunus avium* L.) в условиях *in vitro* было положено Tukey в 40-х годах прошлого столетия [20]. Для выведения раносозревающих сортов были проведены опыты с культурой зародышей персика и черешни. На протяжении последующих десятилетий создание новых сортов являлось ведущим направлением биотехнологических исследований косточковых плодовых культур.

В настоящее время в связи с высокой степенью поражения вирусной, бактериальной и грибной инфекцией промышленных насаждений методы биотехнологии активно применяют для получения оздоровленного ценного посадочного материала [3, 5-7, 11]. Так, разными авторами указывается высокая степень поражения сортов черешни (30-90%), едва вступившие в полное плодоношение сады становятся нерентабельными. В частности, в Крыму на черешне обнаружены вирусы некротической кольцевой пятнистости листьев (PNRSV), скручивания листьев черешни (CLRV), мозаики резухи (AMV), хлоротической кольцевой пятнистости листьев (ClRSV) [3-5, 11]. В связи с тем, что вирусы являются облигатными внутриклеточными патогенами растений, прямая борьба с ними практически невозможна. В последние годы исследования по оздоровлению растений интенсивно проводятся в Никитском ботаническом саду–Национальном научном центре [3, 7]. В наших исследованиях, несмотря на использование в опытах отобранных со здоровых растений эксплантов, при их культивировании применялись профилактические мероприятия от патогенов – вводились в питательную среду вироциды.

Получение в условиях *in vitro* растений является актуальным для видов с низкой способностью к побегообразованию и, в особенности, к ризогенезу. Из литературных источников известно, что черешня относится к трудноразмножаемым культурам. В процессе клонального микроразмножения отмечена низкая способность формирования микропобегов и развития корней [1, 8, 9, 15, 16, 18, 19]. Поэтому, несмотря на имеющиеся экспериментальные работы, многие вопросы культивирования черешни до сих пор остаются малоизученными. Цель данной работы – выявить морфогенетический

потенциал органов и тканей разных генотипов черешни в культуре *in vitro* и получить полноценные регенеранты.

## Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлись сорта черешни (Призерша, Рубиновая Ранняя, Сказка, Талисман и Анонс) разных сроков созревания плодов. При постановке опытов применяли как общеизвестные методы, так и разработанные в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС–ННЦ [2, 8, 10]. Отбор черенков осуществлялся с внешне здоровых и предварительно протестированных на отсутствие вирусов деревьев в зимний (декабрь − февраль), весенний (март, апрель), летний (июнь, август) и осенний (ноябрь) периоды. Тестирование проводили с использованием растений-индикаторов: *Chenopodium foetidum* Schrad., *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. ('Samsun'), *Cucumis sativus* L. ('Delikatess') и методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для освобождения растительного материала от экзогенной бактериальной и грибной инфекций в качестве стерилизующих агентов применяли растворы этанола и гипохлорита натрия. Для гарантии получения здоровых регенерантов в качестве профилактики в питательную среду вводили вироцид – рибовирин в концентрации 1-3 мг/л. Микропобеги культивировали на питательных средах Gamborg и Eveleigh (B5) [14], Murashige и Skoog (MS) [17] и в наших модификациях. Для индукции множественного побегообразования и ризогенеза в питательную среду вводили регуляторы роста: 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрациях 1,0-4,4 мкМ, $N^6$-(2-изопентил)аденин (2ip) – 1,97-3,94 мкМ, гиббереллoвая кислота ($ГК_3$) – 0,15-2,89 мкМ, β-3-индолилмасляная кислота (ИМК) − 2,46-7,35 мкМ, α-нафтилуксусная кислота (НУК) − 5,37-10,74 мкМ, индолилуксусная кислота (ИУК) − 2,85-5,71 мкМ. Пробирки с микропобегами помещали в культуральную комнату с заданным режимом (интенсивность освещения 2,0-2,5 клк, 16 часовой фотопериод и температура 24±1°С). Статистическую обработку данных проводили на компьютере с использованием программного обеспечения Microsoft Office Exel 2003.

## Результаты и обсуждение

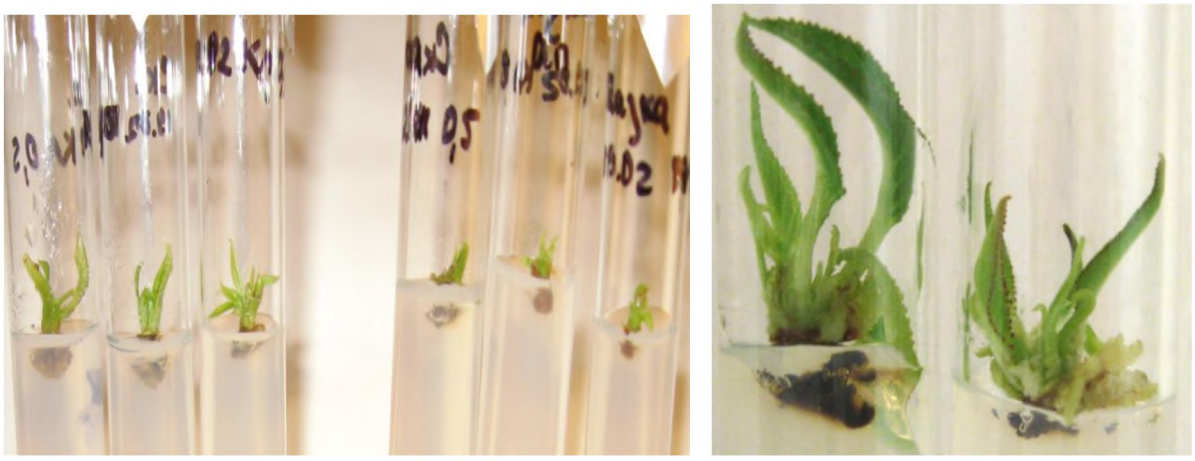
В работе с культурой тканей и органов черешни использовали сортообразцы, свободные от вирусной инфекции, предварительно протестированные на отсутствие вирусов с применением методов травянистых растений-индикаторов. Для введения эксплантов в условия *in vitro* были отработаны режимы стерилизации с применением разных концентрациий гипохлорита натрия и установлено, что почки сортов раннего и раннесреднего сроков созревания плодов (Призерша и Рубиновая Ранняя) наиболее чувствительны к действию стерилизующего агента. Менее повреждались почки сортов Талисман и Сказка.

Для успешной регенерации микропобегов важное значение имеют приемы изолирования первичных эксплантов. Показано, что активно развиваются экспланты всех изучаемых сортов черешни, у которых при введении в стерильные условия на питательные среды MS и B5 срез в базальной (нижней) части проведен под углом 40-45°. В этом случае отмечено появление зачатков листьев через 4 суток культивирования *in vitro*, в то время как микропобеги с ровным срезом в базальной части только увеличились в размерах (рис. 1).

Отличия в развитии сохраняются на протяжении последующих 1-2 пассажей: у микропобегов в опытном варианте листья сформированы и увеличились в размерах, в то время как в контрольном варианте (с ровным срезом в базальной части) листовые пластинки еще полностью не раскрыты (рис. 2).

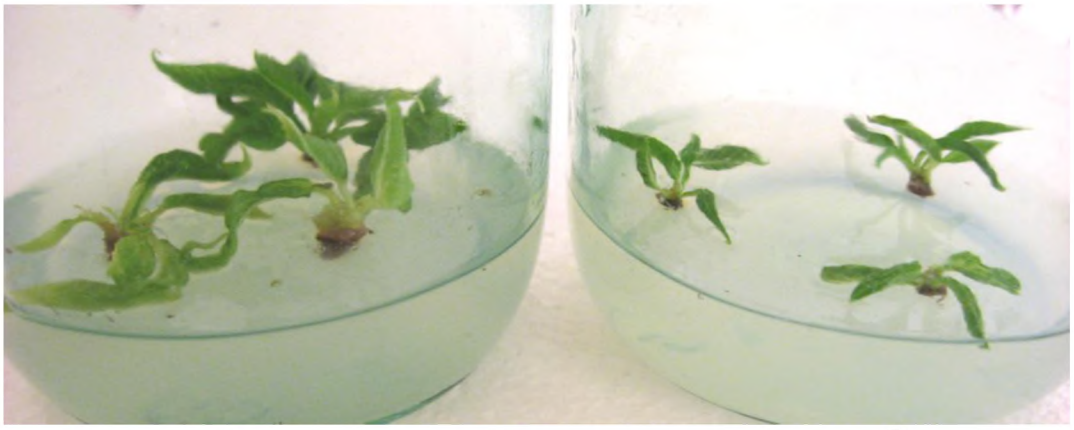
Для снятия апикального доминирования и индукции множественного побегообразования были испытаны регуляторы роста БАП (1,0-4,4 мкМ), 2ip (1,97-3,94 мкМ) и $ГК_3$ (0,15-2,89 мкМ) в разных концентрациях и сочетаниях. Показано, что

эксплантыи черешни сортов Призерша, Рубиновая Ранняя и Анонс, введенные в условия *in vitro*, на питательной среде, дополненной 2ip и $ГК_3$, незначительно увеличиваются в размерах и темнеют, при этом на среде с добавлением БАП и $ГК_3$ у эксплантов формируются зеленые листья.



а б а б

**Рис. 1. Микропобеги черешни через 4 суток культивирования:**
**а − со срезом в базальной части под углом 40-45°; б − с ровным срезом в базальной части**



а б

**Рис. 2. Микропобеги черешни через 40 суток культивирования:**
**а − со срезом в базальной части под углом 40-45°; б − с ровным срезом в базальной части**

На этапе собственно микроразмножения высоким морфогенетическим потенциалом обладали микропобеги сортов среднего и позднесреднего сроков созревания плодов (Сказка и Талисман). Формирование конгломератов микропобегов отмечали через 25-30 суток культивирования на модифицированной питательной среде МС, дополненной 1,0-4,4 мкм БАП и 0,44-2,88 мкМ $ГК_3$. Как показали исследования, коэффициент размножения микропобегов сортов Сказка, Талисман и Анонс (1:16-1:20) был выше, чем у сортов Призерша и Рубиновая Ранняя раннего и раннесреднего сроков созревания плодов (1:1-1:4) (рис. 3).

Заключительным этапом микроразмножения *in vitro* является укоренение полученных микропобегов. Для индукции ризогенеза были испытаны как агаризированные, так и жидкие питательные среды, которые являлись модификациями среды MS с уменьшенным вдвое содержанием макросолей, дополненные регуляторами роста ауксинового ряда.

Успешное укоренение микропобегов происходило на питательных средах, содержащих 2,85-5,7 мкМ ИУК и 5,37-10,7 мкМ НУК соответственно.

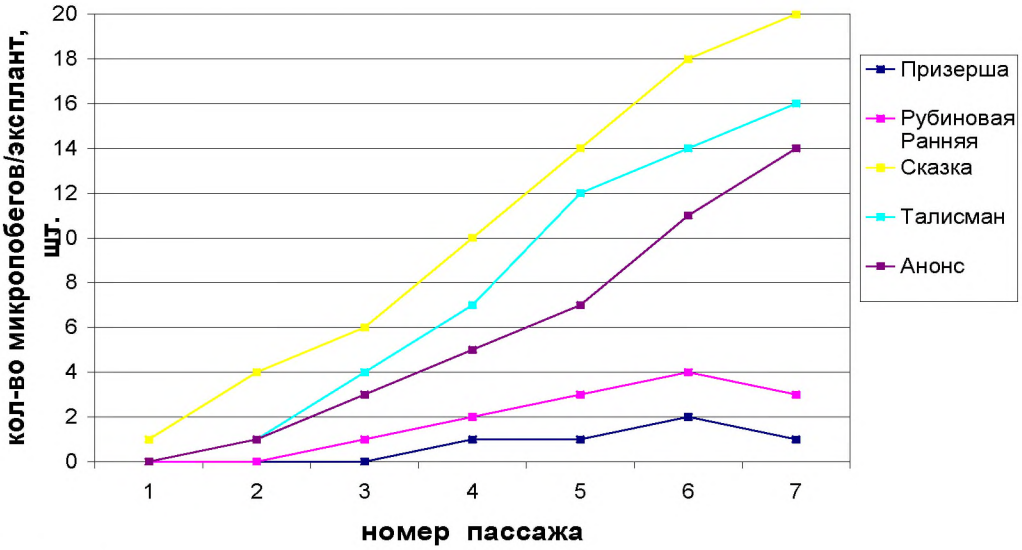



**Рис. 3. Влияние генотипа на коэффициент размножения микропобегов черешни**

Присутствие в среде ИМК ускоряло появление корней у микропобегов на 4-6 суток по сравнению с контрольным вариантом, однако полученные регенеранты не развивались в нестерильных условиях. Показано, что у микропобегов черешни сорта Сказка корни формировались как на жидкой, так и на агаризированной питательный средах. Однако на среде с агаром корни были многочисленные, в то время как на жидкой среде развилось не более 3-4 корней на микропобег (рис. 4).

**а** **б**

**Рис. 4. Развитие корней у микропобегов черешни: а − на жидкой питательной среде; б − на агаризованной питательной среде**

В ходе опытов наблюдали явление спонтанного ризогенеза у микропобегов сорта Сказка на питательной среде, не содержащей регуляторов роста ауксинового ряда. Из базальной части регенерантов развились тонкие корни (1-3 шт/микропобег), при этом на них формировались корни второго порядка. Подобное явление не характерно для древесных культур и некоторыми авторами объясняется как накопление эндогенных ауксинов в растительных тканях в результате их длительного культивирования (рис. 5).

Полученные регенеранты с развитыми корнями высаживали в стерильный субстрат (смесь торфа, перлита, песка в разных соотношениях) для адаптации в условия *in vivo*.

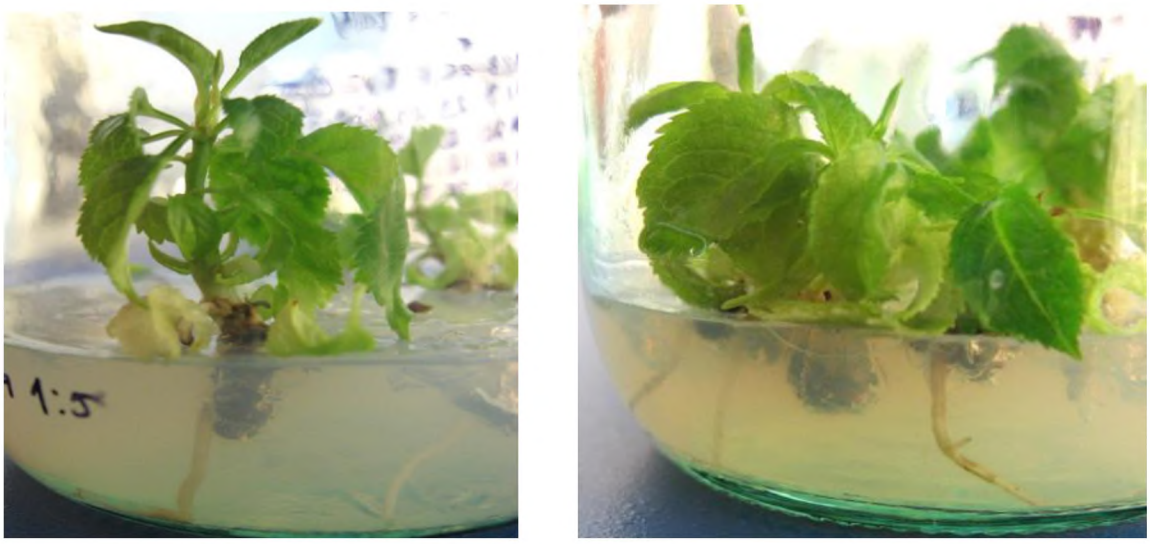


**Рис. 5. Спонтанный ризогенез у микропобегов черешни**

## Выводы

Показано, что лучшее развитие и дифференциацию первичных эксплантов черешни наблюдали в том случае, когда срез в базальной части проведен под углом 40-45°С. Установлено, что микропобеги сортов среднего (Сказка) и среднепозднего (Талисман) сроков созревания плодов обладали более высоким морфогенетическим потенциалом, чем микропобеги сортов с ранним (Призерша), раннесредним (Рубиновая Ранняя) и поздним (Анонс) сроками созревания плодов. Определены регуляторы роста и их концентрации, повышающие эффективность микроразмножения и индукцию корнеобразования. Получены полноценные регенеранты сортов черешни.

## Список литературы

1. Бленда А.В. Мікроклональне розмноження *in vitro* представників підродини *Prunoidae* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2000. – Т. 32, № 5. – С. 428-434.

2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.

3. Биотехнологические системы оздоровления косточковых плодовых культур и получение безвирусного посадочного материала / Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Чирков С.Н., Смыков А.В., Вожегова Р.А. // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. – К.: Логос, 2008. – Т. 5. –2008. – С. 410-415.

4. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. – Кишинев: Штиинца, 1985. – 311 с.

5. Вирусы, поражающие косточковые плодовые культуры, и биотехнологиеские пути создания устойчивых форм / Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Митрофанова И.В., Кузнецова Н.В. // Біоресурси та віруси:V Між. конф., 10-13 вересня 2007. – К., 2007. – С. 182.

6. Высоцкий В.А. Культура изолированных тканей и органов плодовых растений, оздоровление и клональное микроразмножение // С.-х. биология. –1983. – № 7. – С. 42-47.

7. Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений *in vitro* / Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Лукичева Л.А., Смыков А.В., Сенин В.В., Литвинова Т.В. // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91 – С. 111-120.

8. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.

9. Кузнецова Н.В. Влияние регуляторов роста на эффективность регенерации растений при клональном микроразмножении черешни (*Prunus avium* L.) // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2008. – Вып. 97. – С. 52-55.

10. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и плодовых культур / Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. // Труды Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 188-189.

11. Митрофанова О.В., Михайлов А.П., Чехов А.В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур // Труды Никит. ботан. сада – 1997. – Т. 119. – С. 7-34.

12. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В. Состояние и перспективы биотехнологических исследований садовых культур на юге Украины // Садівництво: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – 2000. – Вип. 50. – С. 269-281.

13. Фомина Е.Г., Жук Н.Г. Клональное микроразмножение районированных в Беларуси сортов *Cerasus* // Плодоводство. – 1994. – Т. 9. – С. 64-74.

14. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – V. 46, № 5. – P. 417-421.

15. Gregor Osters, Luthar Zlata, Stampak Franci. The importance of the sterilization proceducing vigorous cherry plants (*Prunus sp.*) *in vitro* // Acta agriculturae slovenica. – 2004. – V. 83. – P. 45-51.

16. Kuznetsova N.V., Mitrofanova O.V Investigation of regeneration ability of four cultivars of sweet cherry (*Prunus avium* L.) in conditions *in vitro* // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: IX междунар. конф. Звенигород, 8-12 сентября 2008 г. – Звенигород, 2008. – С. 60.

17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, № 3. – P. 473-497.

18. Sauer Annemarie. *In vitro* – Vermehrung verschiedener genotypen von *Prunus avium* L. // Gartenbauwissenschaft. – 1983. – Bd. 48. – S. 124-127.

19. Snir Iona. *In vitro* micropropagation of sweet cherry cultivars // HortScience. – 1982. – V. 17, № 2. – P. 735-736.

20. Tukey H.B. Embryo abortion in early-riponing varieties of *Prunus avium* // Bot. Gaz. – 1933. – V. 94. – P. 433-468.

## АЙВА ЗВИЧАЙНА (*CYDONIA OBLONGA* MILL.) В ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ: ПІДСУМКИ ІНТРОДУКЦІЇ І СЕЛЕКЦІЇ

С.В. КЛИМЕНКО, *доктор біологічних наук*
Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Київ

### Вступ

Айва звичайна (*Cydonia oblonga* Mill.) – визнана сировина для одержання желюючих продуктів, завдяки високому вмісту пектинових речовин – природних сорбентів [2, 13]. Плоди айви полівітамінні [18, 22]. Айва звичайна – основна карликова підщепа для груші [19].

Айву культивують більш ніж у 40 країнах світу, однак насадження її у більшості країн невеликі [26]. ФАО не публікує даних про виробництво плодів у країнах світу [1]. Питома вага айви в Україні серед зерняткових культур за площами насаджень складає 0,33%. Щодо валових зборів, то за 1995-2005 рр. айва в структурі садів зерняткових становить 0,42%. Урожайність айви в країні становить 100-250 ц/га залежно від кліматичних умов вирощування, сортових і агротехнічних властивостей. Зараз айву вирощують переважно у приватних господарствах. Вона займає близько 1000 га, або