

УДК 57.085.23;57.085.25

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ГЕНОТИПОВ АБРИКОСА В КУЛЬТУРЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ И ВЫСЕЧЕК ЛИСТЬЕВ

Александр Михайлович Голубев

Частный селекционный питомник,
410511, Россия, Саратовская обл., Саратовский район, пос. Рейник, 1-й Микрорайон, д.
46. biotechnoalgol@mail.ru

Разработана эффективная питательная среда для клонального микроразмножения абрикоса (*Prunus armeniaca* L.) при использовании в качестве эксплантов фрагментов листьев и апикальных меристем. Предложена питательная среда с кондиционирующим фактором для лучшего развития апикальных меристем. Подобраны среды, обеспечивающие хороший коэффициент размножения (3-7) и рост побегов без признаков обводнения. Применены новые эффективные компоненты в составах для укоренения микропобегов.

Ключевые слова: *P. armeniaca*; культура апикальных меристем; клональное микроразмножение.

Введение

Использование методов культуры *in vitro* открывает новые перспективы в селекции и размножении абрикоса. Появляется возможность быстрого размножения ценных генотипов, освобождения их от вирусной инфекции, применения мутагенеза и генной инженерии [2]. В научной литературе есть несколько работ по успешной регенерации растений из апикальных меристем абрикоса [5, 6], но размер первичного экспланта в них слишком велик (0.5-1 мм) для использования этой технологии в получении безвирусного материала. Делались попытки регенерации растений из листовых эксплантов, но результаты плохо воспроизводимы [4] или сильно зависят от генотипа [9]. О соматическом эмбриогенезе у *P. armeniaca* ещё не сообщалось, известна работа только на родственном виде *P. tume* [10]. Целью данной работы являлась разработка питательных сред для эффективной регенерации растений из высечек листьев и апикальных меристем абрикоса.

Объекты и методы исследования

Исследования проводились в 2012-2014 гг. по общепринятым методам культуры органов и тканей растений [1, 3] в лаборатории микроклонального размножения, на базе НПО «Сад и огород», г. Челябинск. Донорами первичных эксплантов служили маточные деревья абрикоса (*Prunus armeniaca* L.) сорта Саратовский рубин® и гибрида 'V-05-2' в частном селекционном питомнике Голубевых, г. Саратов. В качестве эксплантов использовали апикальные меристемы спящих почек и молодых побегов, полученных путем выгонки зимних черенков на специальных растворах, и листочки, взятые с микропобегов, выросших в культуре *in vitro* (сезон эксплантирования – февраль-март). Стерилизацию проводили 5% хлорамином (30 мин.) или 5% гипохлоритом натрия (10 мин). Для каждого типа эксплантата использовали определенный состав питательной среды (табл. 1), разработанный на основе среды Мурасиге и Скуга (MS) [7]. Исследования проводили в 2-х повторях, при этом в каждом эксперименте использовали не менее 15-20 первичных эксплантов.

Результаты и обсуждения

При введении в культуру *in vitro* абрикоса *Prunus armeniaca* L. обнаружено, что инфекция сосредоточена главным образом на месте опадения листьев и под чешуйками почек. Лучшими эксплантами оказались почки после окончания эндогенного покоя и отросшие из них на специальных растворах микропобеги. Наиболее активное прорастание почек прошедших эндогенный покой, проходило в растворе следующего состава: 5 мг/л ИПА (2-изопентенил аденин), 4 мг/л ГК (гибберелловая кислота), 10 мг/л AgNO₃. Отросшие побеги на данном составе легче стерилизовались и содержали меньше внутренней инфекции. Меристемы, выделенные с растущих побегов, продолжали рост только в присутствии кондиционирующего фактора, которым является пептид – глутатион. Для развития меристем абрикоса специально разработана питательная среда 'М2Аб' (табл. 1). Данная среда поддерживала жизнеспособными до 80% эксплантированных меристем размером 0,1-0,3 мм. Из меристем формировался разнородный каллус с зонами морфогенеза. Морфогенным был плотный каллус зелёного цвета или с зелёным оттенком. Морфогенный каллус с зачатками микропобегов, через 3-4 недели пересаживали на среду (СКК1М) для инициации образования множественных морфогенных зон и адвентивных почек. Для нормализации роста или перед этапом укоренения, микропобеги пересаживали на среду М2АбМ.

Чередование сред СКК1М и М2АбМ позволило достигнуть хорошего коэффициента размножения (3-7 побегов на эксплант) и развития нормальных побегов с тёмно зелёными листьями без усыхания верхушек и обводнения, длиной до 40 мм.

Регенерацию микропобегов из высечек листьев осуществляли через индукцию морфогенного каллуса. Каллус с морфогенными зонами и эмбриоподобными структурами индуцировали в темноте из надсеченных листочков с побегов выросших *in vitro*. Каждый лист поперечно надсекался три или четыре раза, без полного разделения высечки. Листья культивировали адаксиальной стороной в контакте со средой.

Таблица 1

Состав сред для всех этапов культивирования абрикоса *in vitro*

Состав среды	Среда 'М2Аб' для развития меристем	Среда 'СКК1М' для индукции адвентивных почек	Среда 'М2АбМ' для развития микропобега	Среда 'Э26' для органогенеза из листьев	Среда '2У65М2' для укоренения побегов
макро соли	по MS	по MS	по MS	по MS	40% от MS
микро соли	по MS	по MS	по MS	по MS	50% от MS
Fe-хелат	по MS	по MS	по MS	по MS	50% от MS
тиамин	1 мг/л	0,5 мг/л	1 мг/л	1 мг/л	2мг/л
пиридоксин	1 мг/л	0,5 мг/л	1 мг/л	1 мг/л	0,5мг/л
никотиновая кислота	1 мг/л	0,5 мг/л	1 мг/л	1 мг/л	0,5мг/л
аскорбиновая кислота	30 мг/л	30 мг/л	30 мг/л	30 мг/л	-
биотин	0,5 мг/л	0,5 мг/л	0,5 мг/л	0,5 мг/л	0,5 мг/л
Са-пантотенат	1 мг/л	0,5 мг/л	1 мг/л	1 мг/л	0,5мг/л
глицин	2мг/л	2мг/л	2мг/л	2 мг/л	2 мг/л
глутатион окисленный	100 мг/л	20 мг/л	100 мг/л	-	-
L-цистеин	-	-	-	10 мг/л	-
инозитол	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л
сахароза	20 г/л	20 г/л	20 г/л	30 г/л	25 г/л
глюкоза	10 г/л	10 г/л	10 г/л	-	-
ИПА	0,5 мг/л	0,5 мг/л	0,5 мг/л	-	0,05 мг/л

транс-зеатин	-	-	0,5 мг/л	-	-
6-БАП	0,5 мг/л	0,5 мг/л	0,3 мг/л	-	-
тидазурон	0,1 мг/л	0,25 мг/л	0,2 мг/л	1 мг/л	-
НУК	-	-	-	0,3 мг/л	-
ИМК	0,01 мг/л	0,01 мг/л	0,01 мг/л	-	0,5 мг/л
ИУК	-	-	-	-	1 мг/л
AgNO ₃	-	0,1 мг/л	0,05 мг/л	-	-
феруловая кислота	-	-	-	-	5 мг/л
кофейная кислота	-	-	-	-	2,5 мг/л
агар	5,5 г/л	5,5 г/л	6 г/л	6 г/л	6 г/л
pH	5,6	5,6	5,75	5,7	5,7

Среда для инициации морфогенеза ‘Э26’ из высечек листьев содержала повышенную концентрацию сахарозы (3%), 1 мг/л тидиазулона и 0,3 мг/л НУК (табл. 1). После пересадки морфогенных структур на среду ‘СКК1М’ и переноса культур на свет, морфогенные зоны окрашивались в зелёный цвет и наряду с зачатками микропобегов формировали эмбриоподобные структуры (рис. 1 Е). Затем адвентивные почки, микропобеги и эмбриоподобные структуры пересаживались на среду ‘М2А6М’ для развития микропобегов или на среду ‘СКК1М’ для дальнейшего размножения. Попыток прямой регенерации растений из эмбриоподобных структур не предпринималось.





Рис.1 Этапы клонального микроразмножения абрикоса

Примечание: А – образование адвентивных почек при культивировании меристем на среде ‘М2Аб’; Б – этап размножения на среде ‘СКК1М’; В – развитие микропобегов из адвентивных почек на среде ‘М2АбМ’; Г – индукция морфогенного каллуса из листа на Среде ‘Э26’ в темноте; Д – субкультивирование морфогенных структур на среде ‘Э26’ на свету; Е – развитие адвентивных почек (АП) и эмбриоподобных структур (ЭПС) на среде ‘СКК1М’; Ж – хорошо развитые микропобеги на среде ‘М2АбМ’ перед пересадкой на укоренение; З, И – микропобеги на среде для укоренения ‘2У65М2’; К – 2-х летний корнесобственный саженец; Л, М – 4-х летнее корнесобственное растение в грунте во время цветения и созревания плодов. Единица измерения на рис. А – Е равна 1 мм.

Экспериментальное укоренение микропобегов абрикоса проводили двумя способами: *in vitro* и *in vivo*. Наиболее удачный состав раствора для укоренения абрикоса, на ряду с ауксином, содержал ингибиторы ИУК-оксидазы: кофейную и феруловую кислоты. Побеги высотой 25-40 мм помещались в колбы или пробирки на среду для укоренения ‘2У65М2’ (табл. 1), выдерживались 7 дней в темноте, а затем культивировались на 16 часовом фотопериоде при температуре 18-22°C (рис. 1 З, И).

Второй способ укоренения проводили по типу зелёного черенкования, то есть, побеги достигшие на питательной среде 25-40 мм отделяли в ламинаре от зон морфогенеза, выдерживали в смеси растворов ауксина 50 мг/л ИМК, 50 мг/л феруловой кислоты и 25 мг/л кофейной кислоты в течении 8 ч в темноте. Обработанные микрочеренки абрикоса помещали в кассеты со смесью стерильного перлита, песка и торфа (2:1:1) и культивировались в микропарнике при температуре 18-22°C и 16 часовом фотопериоде. Через месяц растения пересаживали в горшки объёмом 0,5 л со смесью дерновой земли, нейтрального верхового торфа, перлита и речного песка, в соотношении 1:1:2:2. Доращивание производилось при температуре 22-24°C и 16

часовом фотопериоде, но уже в нестерильных условиях.

Хотя по укоренению абрикоса *in vitro* нами проведены только первые эксперименты, однако они показывают перспективность применения растворов ауксинов с добавлением ингибиторов ИУК-оксидаз. Выход корнесобственных саженцев при использовании обеих способов корнеобразования не превышал 10-15%. Более ранние эксперименты по зелёному черенкованию абрикоса с применением подобного состава показали 30-35% выход укоренённых саженцев. Корнесобственный саженец сорта Саратовский рубин, высаженный в грунт, на третий год зацвёл, а на пятый год показал небольшой урожай.

Выводы

Проведённые исследования по оптимизации состава питательной среды для культуры меристем абрикоса на примере сорта Саратовский рубин[®] и гибрида 'V-05-2' позволили повысить приживаемость эксплантов до 80% и снизить размер выделяемых меристем до 0,1-0,3 мм. Данная среда (М2Аб), как основа может быть применена для освобождения растений от вирусов в случае использования хемо- и термотерапии. Разработанная среда 'СКК1М' для образования множественных зон морфогенеза позволяет быстро размножить ценный селекционный материал, а среда для развития побегов 'М2АбМ' обеспечивает рост неоводненных микропобегов без усыхания верхушек и листьев. Применённые ингибиторы ИУК-оксидаз в средах для укоренения позволили улучшить корнеобразовательный процесс и ускорить рост растений после высадки в грунт.

Результаты проведенных исследований показали возможность индукции побегообразования в культуре высечек листа изучаемых сортов *P. armeniaca*. Регенерация растений из высечек листа происходила через этап каллусогенеза, с последующим формированием зачатков микропобегов и эмбриоподобных структур.

Работа по оптимизации состава сред для культуры абрикоса *in vitro* будет продолжена.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 270 с.
2. Лесникова-Седошенко Н.П., Митрофанова О.В., Смыков А.В., Горина В.М. Применение биотехнологических методов в получении селекционных форм персика (*Prunus persica* (L.) Batch) и абрикоса (*Prunus armeniaca* L.) // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. – 2007. – № 128. – С. 33-40.
3. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф.Л., Сарнацкая В. В., Полищук В.Е. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
4. Escalettes V., Dosba F. In vitro adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp. // Plant Sci. –1993. – 90: 201–209.
5. Hemaïd I., Soliman A. In vitro Propagation of Apricot (*Prunus armeniaca* L.) and Assessment of Genetic Stability of Micropropagated Plants Using RAPD Analysis // World Applied Sciences Journal. – 2012. – 19 (5): 674-687.
6. Murai Y., Harada H. and Yamashita H. In vitro Propagation of Apricot (*P. armeniaca* L.) cv. 'Bakuoh junkyou' // J. Japan. Soc. Hort. Sci. – 1997. – 66 (3-4): 475-480.
7. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15: 473-497.
8. Tsukamoto T., Gao M., Negoro K., Hanada H., Tao R., Kawabe M., Yonemori K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of *Prunus mume*

'Nanko' // Acta Hort. – 2007. – 738: 697-701.

9. Pe'rez-Tornero O., Egea J., Vanoostende A., Burgos L. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot // Plant Science. 2000. –158 (1-2): 61–70.

Golubev A.M. Clonal micropropagation of some apricot genotypes in the culture of apical meristems and leaf cuttings // Woks of the State Nikit. Botan. Gard. – 2017. – Vol. 144. – Part II. – P. 64-69.

For the first time, an effective culture medium for clonal micropropagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) was developed when as explants the leaves cuttings and apical meristems were used. A culture medium with an air conditioning factor is proposed for better development of apical meristems. The media providing a good multiplication index (3-7) and growth of shoots without signs of hyperhydricity have been developed. New effective components were used in the compositions for microshoots rooting.

Key words: *P. armeniaca*; culture of apical meristems; clonal micropropagation.

УДК 634.235:631.527.5

АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОСТЕЙ МЕЖРОДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР С УЧАСТИЕМ МИКРОВИШНИ ПЕСЧАНОЙ (*MICROCERASUS PUMILA* L.) И ПРИЕМЫ ЕЕ ИНТЕНСИФИКАЦИИ

Наталья Николаевна Коваленко

Филиал Крымская ОСС ВИР
г. Крымск, Россия
kross67@mail.ru

В работе представлены результаты межродовой гибридизации с участием микровишни песчаной. Показано, что использование выделенных форм и уже имеющихся гибридов позволяет проводить целенаправленную гибридизацию, как в условиях теплицы, так и в полевых условиях. Данное селекционное направление имеет большие перспективы в создании новых форм вегетативно размножаемых подвоев для персика, алычи, сливы и т.п. Для интенсификации селекционного процесса предложено ряд приемов, таких как отбор родительских форм, выращивание сеянцев из незрелых плодов, скарификация и т.п.

Ключевые слова: микровишня песчаная; гибридизация; вид; сеянцы; скарификация.

Введение

Эволюция косточковых растений убедительно доказывает, что в происхождении большинства дикорастущих видов и многих культурных сортов первостепенная роль принадлежит гибридизации между видами и родами, а также спонтанной полиплоидии и мутагенезу [1– 4]. Существование в перекрывающихся ареалах видов возможно при наличии биологических и генетических барьеров изоляции. Общеизвестно, что она не бывает абсолютной и в результате таких скрещиваний происходит поглощение одного вида другим или возникновение нового [2]. Селекционеры используют различные способы для искусственного преодоления «барьеров» при скрещивании отдаленных видов и родов.

Целью нашей работы был анализ возможности получения практических результатов при межродовой гибридизации косточковых культур с участием микровишни песчаной и приемы ее интенсификации.