Н. Н. Коваленко, зав. лаб. биотехнологии, д.б.н.

С. В. Гладких, мнс

Филиал Крымская опытно-селекционная станция
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт
генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова»,
г. Крымск
kross67@mail.ru

УДК 634.232:631.527:581.143.6

DOI 10.31676/2073-4948-2018-53-14-21

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕЛЕКЦИИ ЧЕРЕШНИ НА ОСНОВЕ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ И КУЛЬТУРЫ ЗАРОДЫШЕЙ *IN VITRO*

Резюме. В ходе работы по созданию новых высокопродуктивных, устойчивых к абиотическим и биотическим условиям среды гибридов и сортов черешни в филиале Крымская ОСС ВИР на практике было использовано сочетание отдаленной гибридизации и культуры изолированных зародышей для преодоления возникшей постгамной несовместимости. В гибридизацию были включены уже созданные донор и источники селекционно значимых признаков, необходимых для выбранной модели сорта. Получены гибриды и клоны второго поколения от скрещивания черешни с вишней сахалинской. Использование пребридинга и эмбриокультуры значительно повышает эффективность селекции на основе межвидовой гибридизации и ускоряет селекционный процесс на 2–3 сезона.

Ключевые слова: гибридизация, пребридинг, донор, источник, *in vitro*, питательная среда, сеянец, клон.

Summary. In the course of work to create new highly productive hybrids and sweet cherry varieties resistant to abiotic and biotic conditions, at Krymsk experimental breeding station of VIR in practice used a combination of remote hybridization and a culture of isolated embryos to overcome postmergency incompatibility was used. The hybridization included the already created donor and the sources of breeding-relevant characteristics required for the selected model variety. Hybrids and clones of the second generation were obtained from crossing the sweet cherry with *Prunus sachalinensis*. The use of prebreeding and embryoculture significantly increases the efficiency of breeding based on interspecific hybridization and accelerates the breeding process for 2–3 seasons.

Key words: hybridization, prebreeding, donor, source, *in vitro*, nutrient medium, seedling, clone.

Введение

Создание новых высокопродуктивных и адаптивных сортов и подвоев – насущная проблема, стоящая перед селекционерами, занимающимися плодовыми культурами. Эту проблему можно решить, привлекая в селекционные программы в качестве родительских форм отдалённые видообразцы. А для преодоления возникающей при этом постгамной несовместимости ис-

пользуется культура зародышей *in vitro* с последующим, при необходимости, микроклонированием единичных растительных объектов.

Для селекционных программ по созданию сортов черешни (*Prunus avium* L.) значимы генотипы, характеризующиеся такими ценными признаками как крупноплодность, урожайность, зимостойкость и устойчивость к основным вредоносным заболеваниям. Вопрос об интрогрессии генов отдельных признаков, например, устойчивости к различным стрессорам, имеющих у дикорастущих видов, в генотипы сортов *Cerasus* Mill. возникал довольно часто (Еремин, 1985; Колесникова, Федотова, 2002; Джигадло, Седышева, Колесникова, 2002; Коваленко, 2014).

Более эффективно и в короткие сроки получить новые сорта определенной модели позволяет включение в селекцию выделенных уже доноров и источников ценных признаков. А при использовании комплексных доноров можно синтезировать новые сорта ещё быстрее: на один-два гибридных поколения.

Само создание комплексных доноров, которые имели бы высокие показатели таких признаков как высокое качество плодов, продуктивность, технологичность и устойчивость к стрессорам, требует длительного времени, предусматривая скрещивание нескольких выделенных источников определенных признаков.

Такая работа проводится в научных учреждениях, занимающихся изучением генофонда, включая гибридные фонды полиплоидов, мутантов, отдаленных гибридов. Результатом их выявления являются опубликованные каталоги паспортов [1]. Большое значение приобретает предварительная селекция различных плодовых культур [2]. Благодаря такому пребридингу селекционерам для синтеза новых сортов выбранной модели следует использовать уже созданные необходимые доноры и источники ценных признаков для конкретных скрещиваний.

При отдаленной гибридизации большое значение имеет и отбор отцовских форм – пребридинг генотипов дикорастущих косточковых плодовых культур. Причём при гибридизации на уровне межвидовых и межродовых скрещиваний имеет значение преодоление эффекта несовместимости видов, а также «разрыва» сцепления ценных признаков (таких как устойчивость к биотическим и абиотическим стрессорам) с отрицательными. Зачастую это такие признаки дикорастущих видовобразцов, как мелкоплодие и низкие показатели качества плодов [3].

Цель: повысить эффективность селекции черешни на основе отдаленной гибридизации при использовании культуры зародышей *in vitro* с последующим микроклональным размножением.

Материал и методика

Работа выполнялась в период 2015–2017 гг. в филиале Крымская ОСС ВИР с использованием коллекции генетических ресурсов растений ВИР.

В скрещиваниях участвовал и донор крупноплодности — черешня сорта Крупноплодная, и три видообразца, источники селекционно-значимых признаков вишни сахалинской *P.sachalinensis* Komar. et Klob.-Alis. В культуру *in vitro* введены зародыши от второго поколения гибридных комбинаций.

Черешня сорта Крупноплодная ($2n = 16$) была взята в качестве материнской формы в соответствии с её описанием, приведенным в работе [1]. Она имеет следующее происхождение: Наполеон белая $\times$ смесь пыльцы сортов черешни (Валерий Чкалов, Эльтон, Жабуле), отселектирована в институте орошаемого садоводства УААН, Украина (авторы М. Т. Оратовский, Н. И. Туровцев), выделена в СКЗНИИСиВ Алехиной Е.М. в качестве донора крупноплодности (полигенный признак, хорошо наследуется гибридным потомством) имеет такие положительные признаки, как стабильная урожайность, высокая зимостойкость, частичная самоплодность.

В качестве отцовских форм были использованы видообразцы вишни сахалинской, БГ-30, 1-215, Dr. Edwin Müller ($2n = 16$), выделенные в качестве комплексных источников таких признаков, как зимостойкость, продуктивность, раннее созревание плодов и практическое отсутствие характерной для вида горечи в их мякоти, а также устойчивость к основным вредоносным заболеваниям (коккомикоз, монилиоз, кластероспориоз) [1, 4].

В результате от выше приведенных скрещиваний 1996–1999 годов получено первое поколение гибридов. Из их числа отобраны плодовые с промежуточным морфотипом.

В 2015–2017 гг. продолжена селекционная работа при использовании в качестве материнских форм отборов из F₁: 47-3, 54-4, 52-1, а в качестве опылителей — смеси пыльцы черешни и вишни сахалинской (рис. 1).

Рис. 1. Схема гибридизации черешни с вишней сахалинской

Была взята в исследования и гибридная комбинация обратного направления: вишня сахалинская БГ-30 × черешня, F1 (2-14)] × смесь пыльцы.

Исследования выполняли по «Программе и методике изучения сортов коллекции плодовых, ягодных, субтропических, орехоплодных культур и винограда» (ВИР, 1970). В ходе работы использовались методики постановки и проведения опытов А. И. Здруйковской-Рихтер [5], Н. Н. Коваленко, Н. В. Поливара [6] по современной методологии [7].

В работе использовалось биотехнологическое оборудование, включая рециркулятор воздуха бактерицидный ОБР-30, облучатель ОБН-1×30, ламинарные боксы, стеллажи для выращивания рассады с подсветкой и др.

Исходным материалом для проведения работ *in vitro* были плоды (косточки), полученные от опыления вышеуказанных четырёх гибридных комбинаций (F2). Зародыши вычленили из косточек в асептических условиях ламинарных боксов марки ВЛ-12 и высаживали в стеклянные пробирки с питательной агаризированной средой.

Результаты опытов

Для эмбриокультуры очень важно создание соответствующих условий, а именно: подбор искусственных питательных сред с учётом генотипа зародыша, его стадия развития на дату ввода в культуру *in vitro*, температурный режим воздуха, его влажность и фотопериод в условиях светозала и комнаты доращивания *in vivo*.

В результате опытов по выращиванию сеянцев черешни с видами вишни, наиболее приемлемы для активного развития их зародышей, оказались два варианта модифицированной питательной среды Мурасиге и Скуга (1962) – М-S на этапе ввода в культуру *in vitro* (табл. 1).

Таблица 1. Варианты модифицированной питательной среды Мурасиге и Скуга (1962) на этапе ввода в культуру *in vitro* гибридов

Компоненты питательной среды	Модифицированная питательная среда на основе М-S	
	М ₃	М ₅
Основной состав, мг/л	по прописи	по прописи
Витамины, мг/л	B ₁ – 0,5; B ₆ – 0,5; PP – 2,0; C – 1,0; мезоинозит – 100,0	B ₁ – 0,1; мезоинозит – 100,0
Аминокислоты, мг/л	глицин – 2,0	глутамин – 2,0
Фитогормоны, мг/л	кинетин – 0,2; ГК – 0,5; α-НУК – 0,5	6-БАП – 0,2
Сахароза, г/л	20,0	10,0
pH	5,6	5,7

На них развивалось большинство гибридов. Кроме подбора состава питательной среды для культивирования зародышей имеют значения и сроки сбора плодов. Это один из важнейших этапов при работе с эмбриокulturой. Общепринято [5–6], что сроки изоляции зародышей влияют на успешное их введение в культуру *in vitro* и дальнейшее развитие сеянцев. Период «взятия» гибридных косточек для ввода в культуру неразрывно связан с фазой развития самого зародыша, степени его дифференциации. При изучении этого вопроса нами был выбран следующий способ определения даты сбора плодов: точкой отчета была взята дата опыления при искусственной гибридизации или дата — общепринятой фенофазы «массовое цветение» при свободном опылении.

Выделение зародышей из косточек и ввод в культуру *in vitro* гибридов черешни производился в следующие сроки: на 18, 23, 28, 33, 38 день после оплодотворения. Анализ результатов многолетних опытов показал, что наиболее оптимальным сроком изоляции зародышей является 28 или 33 день после опыления (табл. 2). Более ранние сроки «взятия» отрицательно сказывались на выходе сеянцев. Работа с ними усложнялась из-за очень «мягких покровов» косточки и содержимого семени, а при поздних сроках наступал период покоя и зародыши начинали развиваться на 6–8 месяцев позже.

Посадка зародышей *in vitro* в среднем проходила в мае–июне, в зависимости от климатических условий года. Так, в 2016–2017 гг. посадка производилась во II–III декадах мая: 17–18 мая (28 день) первый срок, 23–24 мая (33 день) во второй срок.

Таблица 2. Зависимость выхода сеянцев от даты ввода в культуру *in vitro*

Гибрид черешни, от гибридной комбинации	Ввод в культуру на день (год)	Количество, шт.		Выход сеянцев, %
		зародышей	сеянцев	
Ч.Крупноплодная × В.сахалинская 1-215 → F ₁ (47-3) × смесь пыльцы → F ₂ , №16	28 (2016)	20	4	20
	33 (2016)	20	8	40
	28 (2017)	20	7	35
	33 (2017)	20	10	50
Ч.Крупноплодная × В.сахалинская БГ-30 → F ₁ (52-1) × смесь пыльцы → F ₂ , №17	28 (2016)	20	2	10
	33 (2017)	20	4	20
	28 (2016)	20	3	15
	33 (2017)	20	6	30
Ч.Крупноплодная × В.сахалинская Dr. Edwin Müller → F ₁ (54-4) × смесь пыльцы → F ₂ , №18	28 (2016)	20	1	10
	33 (2016)	20	5	25
	28 (2017)	20	3	15
	33 (2017)	20	7	35

Окончание табл. 2

Гибрид черешни, от гибридной комбинации	Ввод в культуру на день (год)	Количество, шт.		Выход семян, %
		зародышей	сеянцев	
Черешня × В.сахалинская → F ₁ (2-14) × смесь пыльцы → F ₂ , №1	28 (2016)	20	8	40
	33 (2016)	20	3	15
	28 (2017)	20	11	55
	33 (2017)	20	5	25

При благоприятных условиях от даты высадки сеянцев в пробирки до их начала роста проходит в среднем 40 дней, и этот период колеблется от 14 до 72 дней (табл. 3).

Таблица 3. Период прорастания зародышей гибридов черешни в зависимости от даты высадки в пробирки в условиях *in vitro*

Гибрид черешни, F ₂	Срок ввода зародышей в культуру <i>in vitro</i> , на день	Количество дней от ввода в культуру до начала роста сеянцев
№ 16	28	23–40
	33	16–36
№ 17	28	24–26
	33	19–21
№ 18	28	20–24
	33	14–26
№ 1	28	21–26
	33	24–30

Затем наступает время, когда зародыши остаются в периоде покоя и их выход из него может происходить в апреле–мае. Таким образом, наблюдается две волны развития сеянцев: первая практически через две–три недели после посадки и вторая – к следующему сезону (рис. 2).

Конечно, для ускорения селекции первый вариант более желателен, поскольку к апрелю могут быть выращены сеянцы высотой 10–30 см или же, при использовании микрклонального размножения, получены их клоны в необходимом количестве, которые можно высаживать в повторностях для ведения дальнейших исследований (рис. 3).

а) зародыши и проростки
б) укорененные микропобеги
Рис. 2. Развитие в культуре *in vitro* зародышей гибридов черешни и их клонирование

а) единичные растения сеянцев
после культуры зародышей
(слева № 16 – справа № 18)
б) адаптированные *in vivo*
клонированные растения
гибрида (№ 16)

Рис. 3. Гибриды и клоны черешни с вишней сахалинской (F_2) полученные в результате эмбриокультуры

Выводы

Использование уже созданных доноров и источников необходимых ценных признаков при проведении отдаленной гибридизации повышает эффективность селекции черешни по созданию сортов, устойчивых к стрессорам на новой генетической основе, так как сеянцы от этих комбинаций уже несут «заданные» родительские гены.

Показано, что применение эмбриокультуры ускоряет селекционный процесс на 2–3 сезона, поскольку полученные после культивирования сеянцы первого и второго года скрещиваний высажены в теплицу и уже используются селекционерами для закладки последующих опытов. В результате работы подобраны модифицированные питательные среды на основе питательной среды Мурасиге и Скуга (1962) — M_3 , M_5 . Определены оптимальные сроки забора растительного материала (косточек) для ввода в культуру *in vitro* зародышей гибридов черешни, что соответствует 28–33 дню после опыления.

Выращены сеянцы отдаленных гибридов черешни с вишней сахалинской (F_2), а также получены их клоны в необходимом количестве для дальнейшего селекционного отбора.

Список использованной литературы

1. Каталог паспортов доноров и источников селекционно-значимых признаков вишни и черешни / сост.: Г. В. Еремин, Е. М. Алехина, А. В. Крупиков, О. В. Еремина; ГНУ ВНИИ-ГиСПР, ГНУ СКЗНИИСиВ, ГНУ КОСС. — Крымск: ГНУ КОСС, 2009. — 83 с.
2. Еремин Г. В., Дубравина И. В., Коваленко Н. Н., Гасанова Т. А. Предварительная селекция плодовых культур: монография / под ред. Г. В. Еремина. — 2-е изд., перераб. и доп. — Краснодар: КубГАУ, 2016. — 335 с.
3. Курсаков Г. А. Отдаленная гибридизация плодовых растений. — М.: Агропромиздат, 1986. — 112 с.
4. Коваленко Н. Н. Потенциал генофонда видов родов *Microcerasus Webb emend. Spach* и *Cerasus Mill.* и его использование в селекции косточковых культур: автореф. дисс. ... д. б. наук. — Краснодар, 2014. — 47 с.
5. Здруйковская-Рихтер А. И. Культура зародышей в искусственных условиях как метод селекции раносозревающих сортов черешни, персика и груши // Науч. тр. ГНБС. — М., 1964. — Т. 37. — С. 256-259.
6. Использование культуры зародышей *in vitro* для получения раносозревающих сортов черешни и ее отдаленных гибридов: методические указания / сост.: Н. Н. Коваленко, Н. В. Поливара. — Крымск: Филиал Крымская ОСС ВИР, 2016. — 39 с.
7. Коваленко Н. Н. Биотехнологические методы в селекции плодовых культур // Современные методология, инструментарий оценки и отбора селекционного материала садовых культур и винограда (по материалам международной научной конференции): монография. — Краснодар: ФГБНУ СКФНЦСВВ, 2017. — С. 164–181.

N. N. Kovalenko, S. V. Gladkih

Krymsk Experiment Breeding Station, Branch of Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center the N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources",
Krymsk

**INCREASING THE EFFICIENCY OF SWEET CHERRY BREEDING BASED ON
REMOTE HYBRIDIZATION AND EMBRYO CULTURE *IN VITRO***