

## Культивирование зародышей *in vitro* гибридов раносозревающих сортов черешни (*Prunus avium* L.)

Н.Н. Коваленко , С.В. Гладких

Крымская опытно-селекционная станция – филиал Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Крымск, Россия

 e-mail: kross67@mail.ru

Высокоадаптивных технологичных раннеспелых сортов черешни (*Prunus avium* L.) в России недостаточно, поэтому перед селекционерами стоит задача скорейшего их получения. Однако решение данной задачи осложнено очень низкой полевой всхожестью гибридных семян. Цель наших исследований состояла в подборе оптимальных сред и способов уменьшения инфицированности в условиях *in vitro* для получения наибольшего количества полноценных сеянцев сортов черешни от внутривидовой гибридизации и в ускорении селекционного процесса. Работа по культивированию *in vitro* зародышей внутривидовых гибридов от четырех комбинаций скрещивания перспективных сортов и доноров черешни: Валерий Чкалов × Свитхарт, Краснодарская ранняя × Крупноплодная, Ярославна × Свитхарт, Эйфория × Свитхарт по программе «раннее созревание и крупноплодность» была начата с предселекции, выбора материнских и отцовских форм черешни. В ходе исследований определены сроки «забора» плодов для высадки в культуру *in vitro*, соответствующие концу мая – началу июня. Оптимизирован процесс стерилизации от сапрофитной микрофлоры плодов, косточек и семян перед проведением процесса культивирования. Испытаны и оценены на пригодность для культивирования зародышей черешни три модифицированные среды с макро- и микроэлементами на основе сред Мурасиге и Скуга, *Prunus* и Смирнова. По результатам опытов наиболее оптимальной для прорастания и обеспечивающей превосходное питание зародышей признана искусственная питательная среда M<sub>4</sub> на основе среды Мурасиге и Скуга с добавлением в состав аскорбиновой кислоты и сахарозы. При применении разработанной схемы массовое прорастание из зародышей сеянцев черешни гибридных комбинаций скрещивания отмечено в наших опытах уже через полтора месяца после ввода их в культуру. Эффективность выращивания гибридных сеянцев черешни раннего срока созревания с применением культуры зародышей бесспорна, поскольку позволяет получать гибриды в первый год после проведения гибридизации.

Ключевые слова: черешня; селекция; внутривидовое скрещивание; зародыши; питательная среда; витамины; фитогормоны; *in vitro* культивирование.

**Для цитирования:** Коваленко Н.Н., Гладких С.В. Культивирование зародышей *in vitro* гибридов раносозревающих сортов черешни (*Prunus avium* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(6):765-771. DOI 10.18699/VJ19.550

## *In vitro* cultivation of the embryos of hybrid forms of early-ripening sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties

N.N. Kovalenko , S.V. Gladkih

Krymsk Experiment Breeding Station – Branch of Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Krymsk, Russia

 e-mail: kross67@mail.ru

Russia does not possess as many highly adaptable, technological, early-ripening varieties of sweet cherry (*Prunus avium* L.) as would suffice to feel comfortable. Therefore, breeders are faced with the task of obtaining hybrid seeds as soon as possible. This task is not easy because of low field germination rates of hybrid seeds. The goal of our research was to select the best environments and ways to reduce infection while obtaining the largest number of full-fledged sweet cherry seedlings from intraspecific hybridization *in vitro* and to accelerate the selection process. Work on the *in vitro* cultivation of germs of intraspecific hybrids from four combinations of crosses of the promising varieties and sweet cherry donors 'Valerij Chkalov' × 'Svithart', 'Krasnodarskaya Rannaya' × 'Krupnoplodnaya', 'Jaroslavna' × 'Sveethart', 'Eiforiya' × 'Sveethart' under the "early-ripening and large-fruited" program started with prebreeding and the selection of maternal and paternal forms of sweet cherries. In the course of research, the terms of taking fruits for planting *in vitro* culture have been determined, which correspond to the end of May and the beginning of June. The process of sterilization from saprophytic microflora of fruits, stone and seeds before cultivation has been optimized. Three modified media with macro- and microelements based on Murashige and Skoog, *Prunus* and Smirnova were tested and assessed for suitability for cultivation of cherry embryos. According to the results of the experiments, an agarized M<sub>4</sub> artificial nutrient medium based on the Murashige and Skoog formulations with

the addition of ascorbic acid and sucrose was proposed as the most optimal for germination and providing excellent nutrition. Mass germination from bud seedlings of these hybrid combinations of sweet cherry crosses, when applying the developed scheme, was noted in our experiments as early as in the first decade of July, i.e. about a month and a half after putting them into culture. The efficiency of growing hybrid seedlings of early-ripening sweet cherries with the use of embryo culture is indisputable, since it makes it possible to produce hybrids in the same year when the crosses are made.

Key words: sweet cherry; selection; intraspecific hybridization; embryo; nutrient medium; vitamins; phytohormones; *in vitro* cultivation.

**For citation:** Kovalenko N.N., Gladkih S.V. *In vitro* cultivation of the embryos of hybrid forms of early-ripening sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(6):765-771. DOI 10.18699/VJ19.550 (in Russian)

## Введение

Плоды черешни (*Prunus avium* L.) открывают сезон свежих фруктов и ягод наравне с жимолостью и земляникой. Черешня – одна из ценных плодовых косточковых культур, которая пользуется большим спросом у населения. В настоящее время ее производят в Европе, Малой и Средней Азии, Индии, Японии, на Американском континенте, в Австралии. В России она культивируется в основном на юге и в Крыму (Витковский, 2003; Юшев, Еремина, 2007). Несмотря на широкое распространение культуры в мире, высокую ценность ее плодов и постоянно растущий на них спрос, потребности населения в России не удовлетворяются. Недостаточный объем производства товарной черешни обусловлен низкой продуктивностью существующих насаждений, которая зависит в первую очередь от оптимальных для определенного региона возделывания сорто-подвойных комбинаций.

Районированный сортимент для южных регионов РФ в настоящее время включает 24 сорта черешни (Юшев, Еремина, 2007). Однако он не соответствует запросам к культуре со стороны товаропроизводителей и потребителей. Согласно современным требованиям интенсивного садоводства, промышленный сорт черешни должен быть приспособлен к конкретным экологическим условиям, иметь компактную крону и умеренный рост, давать высокие регулярные урожаи, темноокрашенные плоды, желателен универсального назначения, с плотной мякотью, хрящеватой консистенцией и гармоничным вкусом (Алехина, Еремина, 2012). Наибольшую ценность для потребителя представляют сорта раннего срока созревания, но плоды у них более мелкие, чем у позднеспелых сортов. Своевременная всесторонняя оценка интродуцированных сортов и гибридов черешни с целью прямого вовлечения лучших из них в производство и выделение источников хозяйственно ценных признаков для создания новых сортов и гибридов являются актуальной задачей (Алехина, 2009, 2014, 2018; Михеев, Ревякина, 2012; Гуляева, 2015).

Работа по селекции сортов черешни на такие признаки, как раннее созревание и крупноплодность, начата на Крымской ОСС (филиал ВИР) еще в прошлом веке (Еремин, 1985) и продолжается по настоящее время. В ходе этой работы отмечено, что от скрещивания раносозревающих сортов черешни при посеве гибридных косточек в селекционный питомник получается мизерное количество семян (0–1 %) из-за низкой всхожести. Анализ процесса развития зародыша от опыления до прорастания показал,

что гибридные зародыши нежизнеспособны, начиная с ранних стадий их развития, или же происходит формирование недоразвитых зародышей (без корня, альбиносы и т. п.).

Метод культивирования зародышей *in vitro* уже несколько десятилетий занимает важное место при разработке различных селекционных программ по черешне в России (Здруйковская-Рихтер, 1964; Кухарчик, 1994; Ковальчук, Чуканова, 1997; Захарченко, Бунцевич, 2001; Коваленко, 2017) и за рубежом (Balla, Brozik, 1996; Stanys, 1998; Standardi, 2012; Asănică et al., 2016). Из анализа литературных данных следует, что на культуру эмбрионов влияют прежде всего генотип и искусственная питательная среда. Среды при культивировании зародышей составлялись преимущественно зарубежными авторами на основе солей питательных сред Мурасиге и Скуга (Asănică et al., 2016; Dulić et al., 2016). Использовались также варианты питательных сред, созданные на основе состава, предложенного De Fossard (1977). При этом период получения жизнеспособных зародышей составлял от двух до трех лет после ввода в культуру.

В настоящем исследовании приведены результаты разработки схем культивирования зародышей раннеспелых сортов черешни, способствующих быстрому росту сеянцев в тот же год, что и проведенная гибридизация.

## Материалы и методы

Работа по выращиванию в культуре *in vitro* гибридов черешни, полученных на основе внутривидовой гибридизации, выполнялась в лаборатории биотехнологии и биохимии Крымской ОСС филиала ВИР (2017–2019 гг.) и базировалась на предыдущих разработках (Медведева, Старенко, 1998; Коваленко, Поливара, 2014, 2016). Исследования проводили по литературным и разработанным нами методикам (Здруйковская-Рихтер, 1962; Кухарчик и др., 2006; Коваленко, Поливара, 2016) с использованием искусственных питательных сред Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962), *Prunus* и Смирнова (Попов, 1979; Джигадло и др., 2005).

Материалом послужили коллекционные сортообразцы черешни Крымской ОСС филиала ВИР. Из них были выделены лучшие сорта раннего срока созревания (начало июня), пригодные для интенсивного выращивания в условиях юга России (Еремин и др., 2009, 2018). В качестве материнских форм в гибридизацию были взяты четыре сорта черешни раннего срока созревания плодов: Валерий Чкалов, Краснодарская ранняя, Эйфория (Восход), Яро-

славна, а в качестве отцовских – Крупноплодная и Свитхарт. Ниже приведено описание сортов в соответствии с каталогом паспортов доноров и источников селекционно значимых признаков вишни и черешни (Еремин и др., 2009, 2018).

Сорт черешни **Крупноплодная** (Наполеон белая × смесь пыльцы сортов Валерий Чкалов, Эльтон, Жабуле). Использование донора в селекции – создание крупноплодных высококачественных адаптивных сортов. Положительные признаки сорта – стабильная урожайность, высокая зимостойкость, частичная самоплодность. К отрицательным признакам относятся сильнорослость, склонность к растрескиванию плодов и поражение серой плодовой гнилью. С участием этого донора получены элитные формы 17-1-14, 17-3-209, 17-4-5, 17-4-99 (Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия – СКФНЦСВВ), Метеотида, Наслаждение, Обещание, Орифлемма (НИИ орошаемого садоводства, Украина), Легенда млиевская (Млиевский НИИ садоводства, Украина).

Сорт **Краснодарская ранняя** (родословная неизвестна), создан в Северо-Кавказском зональном НИИ садоводства и виноградарства (СКЗНИИСиВ). Рекомендуются как донор признака «раннее созревание». Используется в селекции для создания адаптивных сортов. Положительные признаки сорта – зимостойкость, засухоустойчивость, устойчивость к болезням, продуктивность. Отрицательные признаки – плоды ниже среднего размера, склонность к перегрузке урожаем. С участием этого донора получены элитные формы 17-2-57, 17-2-136 (СКФНЦСВВ).

Сорт **Свитхарт** (Вен × Ньюстар) канадской селекции. Положительные признаки сорта – высокая урожайность, крупные плоды широкоокруглой формы и хороших столовых качеств. К отрицательным следует отнести слабую устойчивость к возвратным заморозкам, низкую засухоустойчивость и слабую устойчивость к грибным болезням.

Сорт **Валерий Чкалов** (сеянец от свободного опыления сорта Кавказская Розовая) выведен совместно ФНЦ им. И.В. Мичурина и Институтом орошаемого садоводства УААН. Обладает средней урожайностью, засухоустойчив. Плоды раннего срока созревания (начало июня), хороших столовых качеств. Отрицательными качествами являются средняя зимостойкость, слабая устойчивость к возвратным заморозкам и недостаточная устойчивость к грибным болезням.

Сорт **Эйфория** (клон сорта Восход) создан на Крымской ОСС ВИР. Плоды раннего срока созревания (начало июня), крупные, широкоокруглой формы, очень хороших столовых качеств. Зимостойкость, засухоустойчивость и урожайность высокие.

Сорт **Ярославна** (сеянец от свободного опыления сорта Дрогана Желтая) отобран на Артемовской ОСС (Украина). Плоды очень раннего срока созревания (конец мая), крупные, сердцевидно-округлой формы, хороших столовых качеств. Урожайность и засухоустойчивость высокие. Отрицательное качество сорта – слабая устойчивость к возвратным заморозкам.

В результате искусственного опыления получены плоды сортов черешни от гибридных комбинаций: Валерий Чкалов × Свитхарт, Краснодарская ранняя × Крупноплодная,

Ярославна × Свитхарт, Эйфория × Свитхарт, которые использовались в дальнейших исследованиях.

Поверхностную стерилизацию семян от сапрофитной микрофлоры проводили последовательно, осуществляя промывку плодов с мылом, а затем их ополаскивание. Стерилизацию косточек и семян выполняли в водном растворе дезинфицирующего препарата NAZ TABS (на основе хлора) – 4.75 г на 500 мл H<sub>2</sub>O. Зародыши высаживали в стерильных условиях в ламинарных боксах ВЛ-12, на ранее приготовленные питательные среды в стеклянные пробирки диаметром 30 мм и высотой 140 мм. Повторность опытов двукратная, по 20 пробирок в каждой повторности. Зародыши вводили в культуру на 33-й день после искусственного опыления цветков, без стадии покоя семян. Процесс культивирования проходил в специальной комнате – светозале, на стеллажах, при освещенности 1 м<sup>2</sup> стеллажа двумя лампами дневного света ЛД-40 с 16-часовым фотопериодом, при температуре воздуха +24 ± 1 °С.

При проведении скарификации косточки нами отмечено, что нередко они содержали «невыполненное» семя (пустые косточки), т. е. после опыления оплодотворение не произошло или зародыши не сформировались. Эмбриоспасение начинали с правильно подобранной питательной среды, компоненты которой должны соответствовать стадии развития зародыша. В ходе предыдущих работ (Коваленко, Поливар, 2014, 2016; Коваленко, 2017) нами оптимизированы питательные агаризированные среды для культивирования зародышей черешни на основе состава среды Мурасиге и Скуга и *Prunus*. В результате выделены среды M<sub>4</sub> и P<sub>1</sub> (табл. 1). В 2017–2019 гг. при проведении испытаний была дополнительно включена питательная среда Смирнова (см. табл. 1).

## Результаты

Ввод в культуру зародышей, полученных от четырех комбинаций скрещивания, на искусственные питательные среды был осуществлен в конце мая – начале июня. Выбраковку по степени инфицированности зародышей, введенных в культуру, проводили через каждые пять дней (табл. 2).

Процентный выход жизнеспособных сеянцев на трех изучаемых средах был примерно одинаков: от 40 до 75 % на P<sub>1</sub>, от 40 до 80 % на M<sub>4</sub> и от 40 до 70 % на Смирнова, в зависимости от гибридной комбинации (см. табл. 2), что свидетельствует об идентичности растительного материала и способа его стерилизации. Наибольшая инфицированность семян наблюдалась у гибридной комбинации Ярославна × Свитхарт: 35 % на P<sub>1</sub>, 40 % на M<sub>4</sub> и 50 % на среде Смирнова. Максимальное количество нежизнеспособных сеянцев, в том числе альбиносов, наблюдалось в комбинации Эйфория × Свитхарт: от 20 % на M<sub>4</sub> до 35 % на P<sub>1</sub> и питательной среде Смирнова. Очень хорошие показатели выхода жизнеспособных зародышей, судя по результатам проращивания сеянцев в культуре, получены нами в гибридной комбинации Краснодарская ранняя × Крупноплодная – 70–80 % (см. табл. 2).

В ходе наблюдений за скоростью прорастания и последующим морфогенезом зародышей в культуре отмечено существенное влияние генотипа на этот процесс.

**Table 1.** Optimal composition of nutrient medium for sweet cherry germ culturing

Component	Concentration, mg/L		
	M <sub>4</sub>	Pr <sub>1</sub>	Smirnova
KNO <sub>3</sub>	1900	1800	80
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	4000	–
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	180	740
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	332	–	–
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	270	270	–
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	24.1	76	–
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	2.2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2	1.4
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.004
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	–
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	–
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	–
Na EDTA·2H <sub>2</sub> O	37.3	37.3	–
Ascorbic acid	1.0	2.0	–
Thiamine-HCl	0.5	0.5	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5	0.5	0.1
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5
Sucrose	20 000	30 000	20 000
Agar	6.5	6.7	–
6-BAP	0.8	0.5	–
KJ	0.08	0.08	0.65
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	–	200
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·3H <sub>2</sub> O	–	–	3.5
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	–	–	3.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	–	–	0.025
KCl	–	–	65
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	–	–	18.6
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	–	332	200
pH	5.6–5.8	5.7	4.8–5.2

Наблюдалась одинаковая реакция зародышей на баланс фитогормонов в питательной среде, независимо от их генотипического происхождения.

В отличие от питательной среды Смирнова, две другие среды (M<sub>4</sub> и Pr<sub>1</sub>) помимо полного состава макро- и микроэлементов по прописи Мурасиге и Скуга имеют определенный лимит допустимых значений по цитокинину – 6-БАП от 0.5 мг/л в среде Pr<sub>1</sub> до 0.8 мг/л в среде M<sub>4</sub>, а также аскорбиновой кислоты – 2.0 мг/л в питательной среде Pr<sub>1</sub> и 1.0 мг/л в среде M<sub>4</sub>. Различаются эти две среды и по содержанию сахарозы (см. табл. 1). Пониженное содержание сахарозы получено также в питательной среде

**Table 2.** The results of the culturing of germs of sweet cherry intraspecific hybrids\* on the modified nutrient medium

Hybrid combination	Number of embryos		
	infected	viable	unviable
Modified nutrient medium Pr <sub>1</sub>			
Valeriy Chkalov × Sweetheart	10 (25)	26 (65)	4 (10)
Krasnodarskaya Rannyaya × Krupnoplodnaya	4 (10)	30 (75)	6 (15)
Yaroslavna × Sweetheart	14 (35)	16 (40)	10 (25)
Euphoria × Sweetheart	6 (15)	20 (50)	14 (35)
Modified nutrient medium M <sub>4</sub>			
Valeriy Chkalov × Sweetheart	6 (15)	28 (70)	6 (15)
Krasnodarskaya Rannyaya × Krupnoplodnaya	4 (10)	32 (80)	4 (10)
Yaroslavna × Sweetheart	16 (40)	16 (40)	8 (20)
Euphoria × Sweetheart	12 (30)	20 (50)	8 (20)
Nutrient medium Smirnova			
Valeriy Chkalov × Sweetheart	14 (35)	20 (50)	6 (15)
Krasnodarskaya Rannyaya × Krupnoplodnaya	6 (15)	28 (70)	6 (15)
Yaroslavna × Sweetheart	20 (50)	16 (40)	4 (10)
Euphoria × Sweetheart	8 (20)	18 (45)	14 (35)

\* Forty embryos for each hybrid combination.

Смирнова. Обозначенные различия в составе питательных сред сказывались на дальнейшем развитии зародышей черешни. Наличие цитокининов (6-БАП) в средах M<sub>4</sub> и Pr<sub>1</sub> ускоряло морфогенез зародышей, стимулируя деление клеток, а культивирование зародышей на питательной среде Смирнова было успешным и без добавления 6-БАП.

Цитокинины индуцируют клеточное деление зародыша. Начало морфогенеза, по всей видимости, достигается воздействием фитогормона 6-БАП. В наших опытах наиболее активно это происходило при его концентрации 0.8 мг/л. В питательной среде M<sub>4</sub> отсутствовали ауксины, как и в среде Pr<sub>1</sub>, где концентрация фитогормона 6-БАП составила 0.5 мг/л. Этим они отличались от более «бедной» среды Смирнова, без фитогормонов и с более низкой концентрацией витаминов.

Содержание в двух первых питательных средах нитратов, ионов аммония, калия, кальция, цинка, железа и магния в достаточном количестве, вероятно, способствовало более быстрому росту клеток в сравнении с третьей средой, о чем можно судить по количеству проросших зародышей (табл. 3). Как видно из результатов развития зародышей от всех гибридных комбинаций внутривидовых скрещиваний, более активный рост происходил на питательных средах M<sub>4</sub> и Pr<sub>1</sub>, где только часть зародышей от скрещивания Эйфория × Свитхарт оставалась в покое даже через семь месяцев после посадки семян

**Table 3.** The results of germ culturing depending on the genetic origin of sweet cherry hybrids and on the nutrient medium

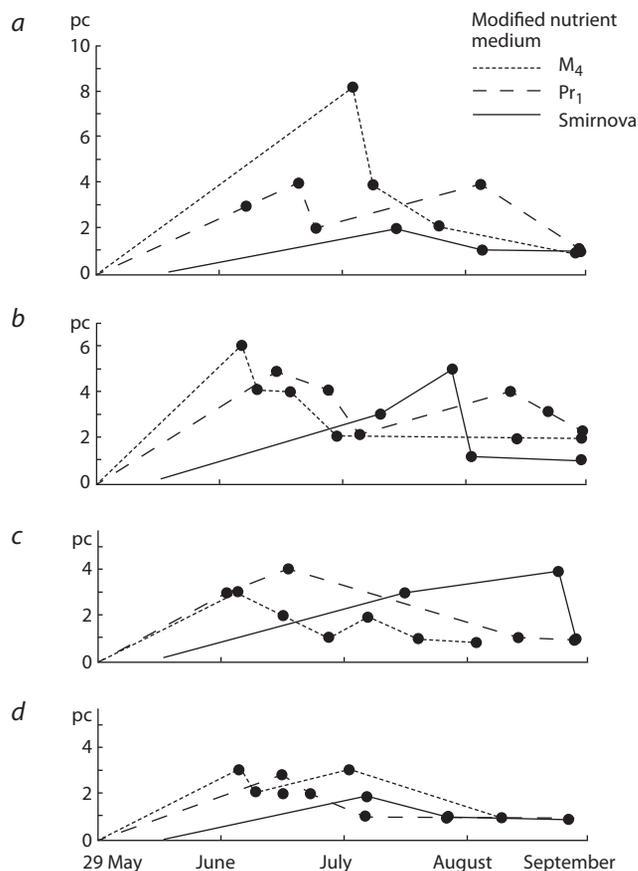
Hybrid combination	Viable, pc	Sprouts	
		pc	%
Modified nutrient medium Pr <sub>1</sub>			
Valeriy Chkalov × Sweetheart	26	26	100
Krasnodarskaya Rannyaya × Krupnoplodnaya	30	30	100
Yaroslavna × Sweetheart	16	16	100
Euphoria × Sweetheart	20	12	60
Modified nutrient medium M <sub>4</sub>			
Valeriy Chkalov × Sweetheart	28	28	100
Krasnodarskaya Rannyaya × Krupnoplodnaya	32	32	100
Yaroslavna × Sweetheart	16	16	100
Euphoria × Sweetheart	20	16	80
Nutrient medium Smirnova			
Valeriy Chkalov × Sweetheart	20	6	30
Krasnodarskaya Rannyaya × Krupnoplodnaya	28	18	64
Yaroslavna × Sweetheart	16	14	87.5
Euphoria × Sweetheart	18	6	33

(см. табл. 3). Питательная среда Смирнова, которая не содержит ауксинов, цитокининов и витамина С и отличается довольно низким содержанием сахарозы (20 г/л), т.е. в целом «нейтральная» по составу, оказалась менее приемлемой для активного развития зародышей. Однако следует отметить, что на такой обедненной питательной среде хорошее развитие и рост зародышей наблюдались для комбинаций скрещивания Краснодарская ранняя × Крупноплодная и Ярославна × Свитхарт.

Продолжительность периода от даты посадки семян на питательные искусственные среды до их прорастания варьирует от 56 до 71 дня на среде M<sub>4</sub> и от 102 до 106 дней на среде Pr<sub>1</sub>. При вводе в культуру зародышей черешни в конце мая их активное прорастание происходит в июле: в первой декаде – на питательной среде M<sub>4</sub>, во второй – на Pr<sub>1</sub>. На питательной среде Смирнова пик прорастания зародышей приурочен ко второй-третьей декаде августа, что в целом характерно для всех комбинаций скрещивания. Активность прорастания гибридных зародышей на трех средах в одной повторности представлена на рис. 1.

Питательная среда M<sub>4</sub> на основе солей среды Мура-сиге и Скуга, имея в своем составе 0.8 мг/л 6-БАП, пониженное количество аскорбиновой кислоты (1.0 мг/л) и сахарозы (20 г/л), в сравнении с питательной средой Pr<sub>1</sub> обладает более приемлемым составом для ускоренного развития зародышей в семенах сортов черешни.

Использование культуры ткани имело положительный результат даже в тех случаях, когда проростки, получен-

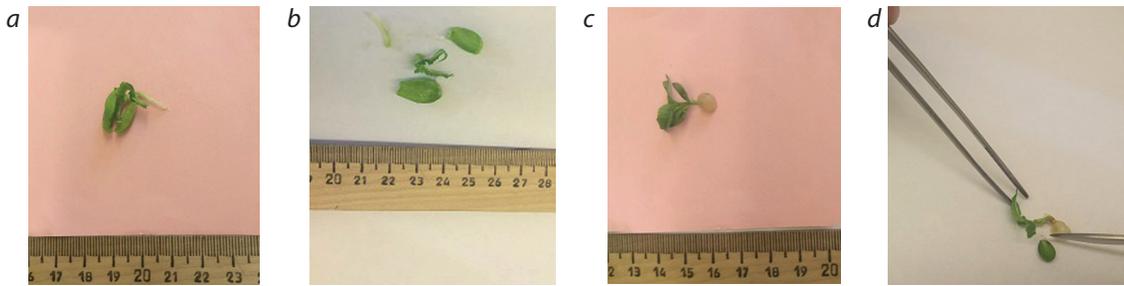


**Fig. 1.** The germination dynamics of germs from hybrid combinations: (a) Valeriy Chkalov × Sweetheart, (b) Krasnodarskaya Rannyaya × Krupnoplodnaya, (c) Yaroslavna × Sweetheart, (d) Euphoria × Sweetheart.

ные из ткани стебля, были лишены первичного корня. Особенно часто такие проростки наблюдались у гибридов Краснодарская ранняя × Крупноплодная (рис. 2).

### Заключение

В ходе работы по программе «раннее созревание и крупноплодность» осуществлялось культивирование *in vitro* зародышей внутривидовых гибридов от четырех комбинаций скрещивания перспективных сортов и доноров черешни: Валерий Чкалов × Свитхарт, Краснодарская ранняя × Крупноплодная, Ярославна × Свитхарт, Эйфория × Свитхарт. Использованные сорта считаются перспективными для конкретной экологической зоны плодородства и служат донорами признаков для получения селекционного материала сортов черешни раннего срока созревания. После искусственного опыления была применена культура зародышей *in vitro*, что дало более значимый эффект от гибридизации и высокий выход сеянцев в сравнении с таковым в полевых условиях селекционного питомника. Оптимизирован процесс обеззараживания плодов, косточек и семян черешни перед культивированием, который заключается в поверхностной стерилизации от сапрофитной микрофлоры: промывка плодов в мыльном растворе с последующим ополаскиванием водой; стерилизация выделенных косточек и семян водным раствором дезин-



**Fig. 2.** Sweet cherry seedlings lacking the primary root: (a, b) Krasnodarskaya Rannaya × Krupnoplodnaya, (c, d) Yaroslavna × Sweetheart.

фицирующего препарата HAZ TABS (на основе хлора) в концентрации 4.75 г на 500 мл воды.

По результатам выбраковки пробирочного материала с инфицированными и нежизнеспособными зародышами черешни, процент выхода жизнеспособных семян на всех питательных средах (Мурасиге и Скуга, Prunus, Смирнова) был примерно одинаков – от 40 до 80 % в зависимости от гибридной комбинации, что свидетельствует об идентичности растительного материала и способа его стерилизации. Хорошие показатели выхода жизнеспособных зародышей наблюдались у гибридной комбинации Краснодарская ранняя × Крупноплодная.

Оптимальными параметрами питательных сред на этапе ввода в культуру зародышей гибридов черешни и дальнейшего их проращивания являются: полный состав макро- и микроэлементов по прописи Мурасиге и Скуга; биологически активные вещества (6-БАП 0.8 мг/л, без ауксинов) и витамины (аскорбиновая кислота 1.0 мг/л, тиамин-HCl 0.5 мг/л, пиридоксин-HCl 0.5 мг/л, никотиновая кислота 0.5 мг/л), при добавлении в среду 20 г/л сахарозы. При использовании трех питательных сред с различным составом активных веществ или даже их отсутствием (среда Смирнова) установлено влияние сортоспецифичности и концентрации веществ на начало роста зародышей, культивируемых *in vitro*. Активный рост семян исследуемых гибридных комбинаций происходит в июле, т. е. примерно через 1.5 месяца после ввода в культуру.

Эффективность выращивания гибридных семян черешни раннего срока созревания с применением культуры зародышей беспорна, поскольку дает положительный результат в отношении не только выхода семян, но и возможности получения гибридов в год проведения гибридизации, что сокращает селекционный процесс по меньшей мере на два года.

## Список литературы / References

Алехина Е.М. Изучение и селекционное использование генетического потенциала черешни при создании новых сортов. В: Роль ВОГиС в современном научном мире: материалы науч.-практ. конф. Кубанского отделения ВОГиС. Краснодар, 2009;152-153. [Alekhina E.M. The study and use of the genetic potential of sweet cherries when developing new varieties. In: The Role of VOGiS in the Modern Academic World: Proceedings of the Sci.-Pract. Conf., Kuban branch of VOGiS. Krasnodar, 2009;152-153. (in Russian)]

Алехина Е.М. Улучшение сортов черешни на основе современной селекции в южном регионе России. Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. 2014;27(3):79-90. Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/14/03/09.pdf>

[Alekhina E.M. Improvement of sweet cherry varieties on the basis of modern breeding in southern Russia. Fruit Growing and Viticulture in southern Russia [Electronic medium]. 2014;27(3):79-90. Available at <http://journal.kubansad.ru/pdf/14/03/09.pdf> (in Russian)]

Алехина Е.М. Интродукция сортов черешни в решении приоритетных задач селекции. Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. 2018;51(3):22-33. DOI 10.30679/2219-5335-2018-3-51-23-33. Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/18/03/03.pdf>

[Alekhina E.M. Introduction of sweet cherry varieties to solve the priority breeding tasks. Fruit Growing and Viticulture in southern Russia [Electronic medium]. 2018;51(3):22-33. DOI 10.30679/2219-5335-2018-3-51-23-33. Available at <http://journal.kubansad.ru/pdf/18/03/03.pdf> (in Russian)]

Алехина Е.М., Еремина О.В. Селекция косточковых культур (черешня). В: Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. Краснодар, 2012;313-328.

[Alekhina E.M., Eremina O.V. Breeding of stone fruits (sweet cherry). In: Modern Methodological Aspects of the Organization of Breeding Process in Horticulture and Viticulture. Krasnodar, 2012; 313-328. (in Russian)]

Витковский В.П. Плодовые растения мира. СПб.: Изд-во «Лань», 2003.

[Vitikovsky V.P. Fruit Plants of the World. St. Petersburg: Lan Publ., 2003. (in Russian)]

Гуляева Н.А. Вишня и черешня. Орел, 2015.

[Gulyaeva N.A. Cherry and Sweet Cherry. Orel, 2015. (in Russian)]

Джигадло Е.Н., Джигадло М.И., Голышкина Л.В. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Орел, 2005.

[Dzhigadlo E.N., Dzhigadlo M.I., Golyshkina L.V. Guidelines for the Application of Biotechnological Methods to Fruit, Berry, and Ornamental Crops. Orel, 2005. (in Russian)]

Еремин Г.В. Отдаленная гибридизация косточковых плодовых растений. М.: Агропромиздат, 1985.

[Eremin G.V. Remote Hybridization of Stone Fruit Plants. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)]

Еремин Г.В., Алехина Е.М., Кружков А.В., Еремина О.В. Каталог паспортов доноров и источников селекционно-значимых признаков вишни и черешни. Крымск, 2009.

[Eremin G.V., Alekhina E.M., Kruzchkov A.V., Eremina O.V. Catalog of Certificates of Donors and Sources of Breeding-significant Traits of Cherries and Sweet Cherries. Krymsk, 2009. (in Russian)]

Еремин Г.В., Еремин В.Г., Еремина О.В., Коваленко Н.Н., Гасанова Т.А., Подорожный В.Н., Чепинога И.С., Гореликова О.А., Пиянина Н.А. Каталог перспективных сортов плодовых и ягодных культур, выделенных из коллекции ВИР. Крымск, 2018.

[Eremin G.V., Eremin V.G., Eremina O.V., Kovalenko N.N., Hasanova T.A., Podorozhny V.N., Chepinoga I.S., Gorelikova O.A., Piyanina N.A. Catalog of prospective varieties of fruit and berry crops, selected from the collection of V.I.R. Krymsk, 2018.]

- nina N.A. Catalog of Promising Varieties of Fruit and Berry Crops Recognized in the VIR Collection. Krymsk, 2018. (in Russian)]
- Захарченко В.В., Бунцевич Л.А. Использование культуры изолированных зародышей черешни в селекции на раннеспелость. В: Генетические ресурсы культурных растений: тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., Санкт-Петербург, 13–16 нояб. 2001 г. СПб., 2001;287-288.
- [Zakharchenko V.V., Buntsevich L.A. Use of a culture of isolated sweet cherry germs in the breeding for early ripening. In: Genetic Resources of Cultivated Plants: Abstracts from the International Sci.-Pract. Conf., St. Petersburg, November 13–16, 2001. St. Petersburg, 2001;287-288. (in Russian)]
- Здрукковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*. М., 1962.
- [Zdryukovskaya-Richter A.I. Culturing of Isolated Germs and Some Other Methods of Growing Plants *in vitro*. Moscow, 1962. (in Russian)]
- Здрукковская-Рихтер А.И. Культура зародышей в искусственных условиях как метод селекции ранозревающих сортов черешни, персика и груши. Науч. тр. ГНБС. М., 1964;37:256-259.
- [Zdryukovskaya-Richter A.I. Culturing of germs under artificial conditions as a method of breeding of early-ripening varieties of sweet cherry, peach, and pear. Proceedings of the State Nikita Botanical Gardens. Moscow, 1964;37:256-259. (in Russian)]
- Коваленко Н.Н. Биотехнологические методы в селекции плодовых культур. В: Современные методология, инструментарий оценки и отбора селекционного материала садовых культур и винограда (по материалам междунар. науч. конф.). Краснодар, 2017; 164-181.
- [Kovalenko N.N. Biotechnological methods in the breeding of fruit crops. In: Modern Methodology and Tools for Assessing and Selecting the Breeding Material of Horticultural Crops and Grapevine (compiled from the proceedings of the Int. Sci. Conf.). Krasnodar, 2017;164-181. (in Russian)]
- Коваленко Н.Н., Поливарова Н.В. Эмбриокультура в селекции косточковых плодовых и декоративных культур. В: Субтропическое и декоративное садоводство (науч. тр.). Сочи, 2014;51: 200-206.
- [Kovalenko N.N., Polivara N.V. Embryo culturing in the breeding of stone fruit and ornamental crops. In: Subtropical and Ornamental Gardening (academic studies). Sochi, 2014;51:200-206. (in Russian)]
- Коваленко Н.Н., Поливарова Н.В. Использование культуры зародышей *in vitro* для получения ранозревающих сортов черешни и ее отдаленных гибридов. Крымск, 2016.
- [Kovalenko N.N., Polivara N.V. The Use of *In Vitro* Germ Culture for the Production of Early-ripening Varieties of Sweet Cherry and its Distant Hybrids. Krymsk, 2016. (in Russian)]
- Ковальчук И.Ю., Чуканова И.И. Получение раннеспелых сортов плодовых культур методом доразраивания недоразвитых зародышей *in vitro*. В: Материалы Республиканской науч.-практ. конф. по картофелеводству и овощеводству в Казахстане. Кайнар, 1997;18-19.
- [Kovalchuk I.Yu., Chukanova I.I. Development of early-ripening varieties of fruit crops by growing underdeveloped germs *in vitro*. In: Proceedings of the Republican Scientific and Practical Conference on Potato and Vegetable Growing in Kazakhstan. Kainar, 1997;18-19. (in Russian)]
- Кухарчик Н.В. Культура зародышей *in vitro* в селекции *Cerasus* на раннеспелость. Плодоводство. Самохваловичи, 1994;9(1):56-63.
- [Kukharchik N.V. *In vitro* embryo culture in the breeding of *Cerasus* for early ripening. Plodovodstvo. Samokhvalovichi = Fruit Growing. Samokhvalovichi. 1994;9(1):56-63. (in Russian)]
- Кухарчик Н.В., Кастриска М.С., Пугачев Р.М. Методика культивирования изолированных зародышей вишни и сливы. Плодоводство. Самохваловичи, 2006;18(2):157-162.
- [Kukharchik N.V., Kastritskaya M.S., Pugachev R.M. Method of culturing isolated germs of cherry and plum. Plodovodstvo. Samokhvalovichi = Fruit Growing. Samokhvalovichi. 2006;18(2):157-162. (in Russian)]
- Медведева Н.И., Старенко А.Л. Культивирование зародышей плодовых культур на искусственных питательных средах. Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. 1998;153:64-69.
- [Medvedeva N.I., Starenko A.L. Culturing of germs of fruit crops on artificial nutrient media. Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1998;153:64-69. (in Russian)]
- Михеев А.М., Ревякина Н.Т. Вишня и черешня. М., 2012.
- [Mikheev A.M., Revyakina N.T. Cherry and Sweet Cherry. Moscow, 2012. (in Russian)]
- Попов Ю.Г. Оздоровление и размножение плодовых и ягодных растений методом культуры меристематических верхушек. М., 1979.
- [Popov Yu.G. Improvement and Reproduction of Fruit and Berry Plants by the Method of Culture of Meristematic Apices. Moscow, 1979. (in Russian)]
- Юшев А.А., Еремина О.В. Вишня. Черешня. М., 2007.
- [Yushev A.A., Eremina O.V. Cherry, Sweet Cherry. Moscow, 2007. (in Russian)]
- Asănică A., Tudor V., Plopa C., Sumedrea V., Peticilă A., Teodorescu R., Tudor V. *In vitro* embryo culture of some sweet cherry genotypes. Agric. Agric. Sci. Procedia. 2016;10:172-177.
- Balla I., Brozik S. Embryo culture of sweet cherry hybrids. Acta Hort. 1996;410:385-386. DOI 10.17660/ActaHortic.1996.410.60.
- De Fossad R.A. Tissue culture in horticulture – a perspective. Acta Hort. 1977;78:455-459. DOI 10.17660/ActaHortic.1977.78.57.
- Dulić J., Miodragović M., Barać G., Ognjanov V. Effect of embryo development on *in vitro* germination of early ripening varieties in sweet cherry (*Prunus avium* L.). Agric. J. 2016.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962;15:473-497. DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Standardi A. Encapsulation: promising technology for nurseries and plant tissue laboratories. AgroLife Sci. J. 2012;1(1):48-54.
- Stanys V. *In vitro* techniques to increase the output of cherry seedlings from early-ripening parents. Acta Hort. 1998;468:203-208.

#### ORCID ID

N.N. Kovalenko orcid.org/0000-0002-5287-7635  
S.V. Gladkih orcid.org/0000-0002-7817-6909

**Acknowledgments.** This work was conducted with material from collections of genetic resources of VIR and supported by State Budgeted Project No. 0662-2019-0004 for VIR.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received June 10, 2019. Revised August 1, 2019. Accepted August 1, 2019.