

УДК 634.2:631.52:632.938.1

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ,  
УСКОРЯЮЩИХ СЕЛЕКЦИЮ  
КОСТОЧКОВЫХ ПЛОДОВЫХ  
КУЛЬТУР НА АДАПТИВНОСТЬ**

Кузнецова Анна Павловна  
канд. биол. наук

Ефимова Ирина Львовна

*Государственное научное учреждение  
Северо-Кавказский зональный научно-  
исследовательский институт садовод-  
ства и виноградарства Россельхозака-  
демии, Краснодар, Россия*

Ленивцева Мария Сергеевна  
канд. с.-х. наук

*Всероссийский научно-  
исследовательский институт  
растениеводства им. Н.И. Вавилова,  
Санкт-Петербург, Россия*

Кухарчик Наталья Валерьевна  
д-р с.-х. наук, доцент

Кастрицкая Манана Сергеевна  
канд.с.-х. наук

*Республиканское унитарное предприятие  
«Институт плодоводства Национальной  
академии наук Беларуси»,  
Самохваловичи, Беларусь*

По результатам совместных исследований СКЗНИИСиВ и Института плодоводства (Беларусь) представлены эффективные методы размножения *in vitro* отдаленных гибридов рода *Cerasus* Mill., представляющие интерес как доноры и источники устойчивости к коккомикозу и как новые формы подвоев для вишни, черешни и сакур.

**Ключевые слова:** ПОДВОИ  
КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР,  
УСТОЙЧИВОСТЬ К КОККОМИКОЗУ,  
РАЗМНОЖЕНИЕ IN VITRO

UDC 634.2:631.52:632.938.1

**WORKING OUT OF METHODS  
ACCELERATING SELECTION OF  
THE STONE FRUIT CROPS  
ON ADAPTABILITY**

Kuznetsova Anna  
Cand. Biol. Sci.

Efimova Irina

*State Scientific Organization North  
Caucasian Regional Research Institute of  
Horticulture and Viticulture of the Russian  
Academy of Agricultural Sciences,  
Krasnodar, Russia*

Lenivtseva Maria  
Cand. Sci. Agr.

*All-Russian Research Organization of Plant  
Industry them. N. Vavilov of the Russian  
Academy of Agricultural Sciences,  
St.-Petersburg, Russia*

Kuharchik Natalia  
Dr. Agr. Sci., Docent

Kastritskaya Manana  
Cand. Sci. Agr

*Republican Unitary Enterprise «Institute  
of Fruit Growing of the National Academy  
of Sciences of Belarus», Samohvalovichi,  
Belarus*

The effective methods of reproduction *in vitro* the remote hybrids of *Cerasus* Mill., that are interesting as donors and stability sources to *Coccomyces hiemalis* Higgins and as new forms of rootstocks for a cherry, a sweet cherry and Japanese cherry tree are presented as results of joint research NCRRIH&V and Institute for Fruit Growing (Belarus).

**Keywords:** STONE ROOTSTOCKS,  
RESISTENCE TO *COCCOMYCES  
HIEMALIS HIGGINS*, REPRODUCTION  
IN VITRO

**Введение.** Наблюдаемое повсеместно изменение климата обусловило увеличение частоты и вредоносности абио- и биотических стрессоров, не-

гativamente отразившихся на урожайности плодовых культур. В этой связи наиболее эффективным способом управления продукционным процессом многолетних плодовых растений и повышения стабильности их плодоношения является селекция устойчивых сортов плодовых культур.

Почвенно-климатические условия юга России наиболее благоприятны для экономически успешного производства плодов косточковых культур, ценных в рационе питания человека. Главным биотическим стрессором в условиях южного региона, снижающим зимостойкость и урожайность деревьев, является наиболее вредоносное заболевание косточковых культур (черешни, вишни) – коккомикоз (возбудитель – *Coccomyces hiemalis Higgins, Blumeriella jaapii (Rehm) Arch.*)

Обострение экологических проблем ускорило сопряженную эволюцию хозяина и паразита, вследствие чего наблюдается постоянное изменение состава патогена. Этот факт заставляет ученых постоянно искать новые источники устойчивости (предпочтительно долговременной), а также разрабатывать пути ускорения селекции на устойчивость к коккомикозу. Для решения задачи весьма востребованы эффективные методы оценки растительных ресурсов косточковых по генетически обусловленной устойчивости к биострессору – коккомикозу.

Дополнительной сложностью при оценке устойчивости плодовых растений, представляющих двухкомпонентную систему, являются те обстоятельства, что подвой и привой обладают самостоятельными генетически обусловленными защитными системами, а также традиционно большая длительность исследований. В этой связи крайне необходима разработка методов экспресс-оценки, которые позволят в короткий срок оценить устойчивость различных типов подвоев и сорто-подвойных комбинаций к био- и абиотическим стрессорам в условиях меняющегося климата.

С целью ускорения селекции косточковых, иммунных к коккомикозу, в СКЗНИИСиВ в кооперации с другими профильными НИУ разрабаты-

ваются методы экспресс-оценки генетических ресурсов на основе использования современных генетико-статистических, биотехнологических и биохимических методов с привлечением инструментария последнего поколения. Постоянный мониторинг состава популяции коккомикоза в Краснодарском крае показал значительную изменчивость её состава, что требует введения в селекционный процесс новых вирулентных биотипов.

В результате многолетней работы в СКЗНИИСиВ выделены формы косточковых с различным типом устойчивости и проведены исследования биохимического состава листьев устойчивых и не устойчивых к коккомикозу форм. По найденным качественным различиям в составе фенольных соединений в листьях сравниваемых форм разработан экспресс-метод оценки устойчивости к коккомикозу на ранних этапах развития растений (патент РФ № 2316951 от 20.02.2008) [1].

Изучение структуры изменчивости биохимических показателей позволило найти генетико-статистические подходы к выявлению корреляции с иммунитетом с помощью математико-статистических методов из категории многомерных и разработать экспресс-метод оценки устойчивости к коккомикозу.

В результате анализа данных за четыре года были получены функции классификации и неравенство, позволяющее относить изучаемые растительные ресурсы к устойчивым или не устойчивым типам (патент РФ № 2343697 от 2009 г.) [2]. В процессе селекции новых генотипов, позволяющих конструировать агроэкосистемы с высокими защитно-компенсаторными реакциями, трудным этапом является доращивание зародышей гибридов, полученных от отдаленной гибридизации, и их дальнейшее размножение *in vitro*. Исследования по разработке и усовершенствованию методов размножения в культуре *in vitro* гибридов от межвидовых скрещиваний устойчивых к коккомикозу косточковых плодовых растений проводятся СКЗНИИСиВ совместно с Институтом плодоводства (Беларусь).

**Объекты и методы исследований.** Полученные в СКЗНИИСиВ в результате отдалённой гибридизации зародыши гибридов косточковых культур рода *Cerasus* Mill в стадии 19-дневного и более возраста оценивались на возможность дорастивания *in vitro* на различных средах.

В СКЗНИИСиВ испытывались три среды – стандартная среда Мура-сиге-Скуга (контроль) [3], модифицированная среда с добавлением 6-бензиламинопурина (6-БАП) (авторское свидетельство №1680021, С.-Петербург) и модифицированная среда с измененной концентрацией витаминов (Крымская ОСС).

В РУП «Институт плодородства» (Беларусь) для введения в культуру зародышей и стратификации использовали среду следующего состава: макро- и микросоли по MS, тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота по 0,5 мг/л; аскорбиновая кислота – 1 мг/л, сахароза – 30 г/л; 6-бензиладенин (6-БА) – 0,6-0,75 мг/л. Пробирки с зародышами помещались в холодильную камеру для прохождения периода покоя. Через 2-3 месяца, после начала активного роста гибридных регенерантов, они были пересажены на среду для пролиферации с добавлением 6-БА (0,6-0,75 г/л) и 1,0 мг/л гибберелловой кислоты (ГК).

**Обсуждение результатов.** Как показали предыдущие исследования и литературные данные [4, 5], для создания новых генотипов, позволяющих конструировать агроэкосистемы с высокими защитно-компенсаторными реакциями, перспективно привлечение в селекцию вишни и черешни других видов рода *Cerasus* Mill. – носителей устойчивости к коккомикозу. Данные по отдаленной гибридизации черешни, вишни с формами восточно-азиатских видов показали, что всхожесть семян при скрещивании их с вишней была крайне низкой – от 0,3 до 5%, с черешней – от 0 до 2%. Метод дорастивания зародышей на искусственных средах позволил повысить всхожесть семян до 90-92% [5].

Исследования показали, что количество нормальных зародышей у отдалённых гибридов резко снижается по мере увеличения возраста плода: у незрелых 20-дневных плодов живых зародышей было в 4-88 раз больше, чем у выделенных из зрелых плодов (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты внутривидовой гибридизации (2004-2005 гг.)

Схемы скрещиваний	Количество опылённых цветов, шт.	Выделено зародышей			
		из 20-дневных завязей		из зрелых плодов	
		%	шт.	%	шт.
Булатниковская × И 4 (С. lannesiana × Франц Иосиф), с кастрацией	500	38,1	190	10	50
Булатниковская и А9 (С. incisa × Полянка) с кастрацией	3219	20,2	650	0,49	16
Молодежная × А <sub>11-17</sub> (С. lannesiana × Франц Иосиф) с кастрацией	2147	36,9	792	0,41	9
Молодежная × А <sub>7-42</sub> (С. incisa × Полянка), с кастрацией	1478	26,4	391	1,28	19
Молодежная × А <sub>7-42</sub> (С. incisa × Полянка), с кастрацией	660	32,4	344	1,21	8
Молодежная × И 4 (С. lannesiana × Франц Иосиф), без кастрации	410	36,5	150	0,73	3

В 2007 году также наблюдалось уменьшение выхода спелых плодов (в 2,5-3 раза) по сравнению с 20-дневными, хорошо развитых и полностью сформированных из них было всего 3% (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты внутривидовой гибридизации, 2007 г.

Схемы скрещиваний	Количество опылённых цветков, шт.	Получено			
		зародышей из 20-дневных завязей		зрелых плодов	
		%	шт.	%	шт.
Норд Стар × АИ-2 (С. lannesiana №2 × Франц Иосиф)	3075	11,2	343	3,9	121
Норд Стар × А <sub>11-17</sub> (С. lannesiana №2 × Франц Иосиф)	461	16,9	78	6,7	31

Использование методов биотехнологии, в частности культуры зародышей *in vitro*, открыло перспективу получения межвидовых гибридов в

необходимом количестве для селекции, проведения генетического анализа и изучения механизмов устойчивости [6]. Однако, культивирование *in vitro* зародышей, находящихся на ранних стадиях развития, нередко осложняется их высокой чувствительностью к составу питательной среды. Поэтому исследования по подбору оптимального состава питательных сред весьма актуальны. Полученные в результате отдалённой гибридизации зародыши в стадии, начиная от 19-дневных, были пересажены на три среды различного состава. При сравнительном анализе было отмечено значительное влияние состава сред на размножение и выход микрорастений (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние разных модификаций среды на размножение зародышей гибридов рода *Cerasus* Mill.

Схема скрещивания	№ гибрида	Среда №1 (к)	Среда №2	Среда №3
Любская × АИ-2	1	+	+	+
	19		+	
	21			+
	26		+	+
	45	+	+	
	227		+	+
	229			+
	230		+	+
	235			+
Краснодарская сладкая × АИ-2	37	+	+	+
	42		+	+
	44		+	+
Норд Стар × АИ-2	56(3)	+	+	+
	60	+	+	+
	(3)65	+	+	+
	72	+	+	+
	91			+
	97	+	+	
	196		+	
Норд Стар × В.мелкопильчатая	132		+	+
Норд Стар × АИ <sub>11-18</sub>	164	+	+	+
Норд Стар × (АИ-2×А-5)	215		+	+
Примечание: + нормальное развитие зародышей на среде; Среда №1 – среда Мурасиге-Скуга (контроль); Среда №2 – среда с добавлением 6-бензиламинопурина (6-БАП); Среда №3 – среда с измененной концентрацией витаминов.				

Как видно из таблицы 3, гибриды ведут себя специфично по отношению к средам. Так, на стандартной среде активно вегетировали только немногие гибриды, тогда как на модифицированных средах почти все растения чувствовали себя хорошо. Некоторые из них были строго специфичны к одной среде, например гибриды № 19 и № 196 росли только на модифицированной среде с добавлением б-бензиламинопурина, а гибриды № 91 и № 235 – только на модифицированной среде с измененной концентрацией витаминов. Были выделены растения, которые эффективно размножались на всех вариантах среды – №№ 1, 37, 56, 60, 65, 72, 164 (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние генотипа на микрклональное размножение зародышевых культур рода *Cerasus* Mill.

Схема скрещивания	№ гибрида	Коэффициент размножения	Максимальный коэффициент
Любская × АИ-2	1	4,06	9
	19	1,00	1
	21	2,75	5
	26	2,94	6
	45	3,00	12
	227	2,67	5
	229	2,40	7
	230	2,89	6
	235	1,67	2
Краснодарская сладкая × АИ-2	37	2,82	5
	42	2,64	5
	44	1,67	4
Норд Стар × АИ-2	56 (3)	3,10	5
	60	3,52	11
	(3)65	3,27	9
	72	2,50	8
	91	2,07	4
	97	1,75	4
	196	1,00	1
Норд Стар × В.мелкопильчатая	132	2,00	3
Норд Стар × АИ <sub>11-18</sub>	164	4,38	11
Норд Стар × (АИ-2×А-5)	215	6,00	9

Можно предположить, что выделенные формы отдалённых гибридов обладают общей высокой адаптационной способностью. При оценке интенсивности образования побегов у различных форм наблюдалась неоднородность даже в пределах одной семьи.

При сравнительном анализе условий выращивания *in vitro* отмечено значительное влияние генотипа на коэффициент размножения гибридов. Выделено девять форм с высокой степенью адаптации на разных средах, из них семь предположительно способны легко размножаться вегетативно, три формы показали большой процент приживаемости (до 90,6%) при посадке *in vivo*.

В результате исследований установлено, что лучшими средами для выращивания отдаленных гибридов, производных восточно-азиатских форм, оказались модифицированные среды Мурасиге-Скуга с добавлением 6-бензиламинопурина (6-БАП) (авторское свидетельство № 1680021, С.-Петербург) и среда, разработанная на Крымской ОСС.

Лабораторией биотехнологии (Институт плодородства, Беларусь) в рамках программы по кооперации исследований проведено доразращивание *in vitro* 305 зародышей гибридов, полученных в СКЗНИИСиВ в результате отдаленной гибридизации вишни с созданными в СКЗНИИСиВ источниками иммунитета к коккомикозу – производными восточноазиатских видов рода *Cerasus* Mill.

Гибридные зародыши были высажены на питательную среду MS в модификации института – дополненную витаминами В<sub>1</sub> (0,5 мг/л), В<sub>6</sub> (0,5 мг/л), РР (0,5 мг/л), С (1,0 мг/л) и цитокинином 6-БА (0,6-0,75 г/л, в зависимости от степени дифференциации зародыша) и гибберелловой кислотой (1,0 мг/л).

По результатам проведенных испытаний выделены 5 гибридов с высоким коэффициентом размножения. При размножении *in vivo* выделились

2 растения с укоренением выше 85%, представляющие интерес для испытания в качестве подвоев для черешни, вишни и сакуры.

В результате совместных исследований размножены гибриды из семей Молодёжная × АИ<sub>11-18</sub> [С.lannesiana №2 × Франц Иосиф], Норд Стар × АИ<sub>11-17</sub> [С.lannesiana №2 × Франц Иосиф], Норд Стар × 3-112 [С. serrulata Нt×Полянка], Молодёжная × АИ<sub>11-18</sub> [С.lannesiana №2 × Франц Иосиф], представляющие собой третье поколение, потенциально обладающее высокой устойчивостью к коккомикозу.

**Заключение.** Получены предварительные данные по выделению лучших по составу сред для доращивания и размножения отдаленных гибридов, производных от иммунных к коккомикозу образцов восточноазиатских видов. Результаты исследований способствуют увеличению эффективности селекционного процесса создания новых гибридов косточковых культур с высокой степенью адаптации.

### Литература

1. Кузнецова, А.П. Способ определения устойчивых к коккомикозу форм вишни и черешни /А.П. Кузнецова, Ю.Ф. Якуба //Патент РФ № 2316951 от 20.2.2008. – Бюл. № 5, 2008.
2. Кузнецова, А.П. Способ определения устойчивых форм вишни и черешни к коккомикозу /А.П. Кузнецова, Ю.Ф. Якуба., С.Н. Щеглов // Патент РФ № 2343697 от 20.1.09. – Бюл. № 2.
3. Муромцев, Г.С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии /Г.С. Муромцев. – М.: Агропромиздат, 1987. – 405 с.
4. Ленивцева, М.С. Устойчивость дальневосточных видов вишни и черемухи к коккомикозу (*Coccomyces hiemalis* Higgins) /М.С. Ленивцева // II Вавиловская Международная конференция «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке». – С.-Пб., 2007. – С. 173-174.
5. Кузнецова, А.П. Использование метода биотехнологии в селекции черешни и вишни на устойчивость к коккомикозу/ А.П. Кузнецова //Использование биотехнологических методов для решения генетико-селекционных проблем.– Мичуринск, 1997. – С. 75-76.
6. Ленивцева, М.С. Стратегические основы селекции косточковых культур на устойчивость к коккомикозу / М.С. Ленивцева, А.П. Кузнецова, С.Н. Щеглов [и др.] // Наука Кубани. – 2008.– № 3. – С. 35-40.