

ВЛИЯНИЕ СРОКОВ ИЗОЛЯЦИИ ЗАРОДЫШЕЙ НА ВЫХОД СЕЯНЦЕВ СОРТОВ ВИШНИ ОБЫКНОВЕННОЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO*

Коваленко Н.Н.*, Поливара Н.В.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Крымская опытно-селекционная станция – филиал ВИР, 353384 Россия, г. Крымск, ул. Вавилова, 12;

*  kross67@mail.ru

Перед селекционерами стоит задача наиболее быстрого выведения сортов вишни обыкновенной *Prunus cerasus* L., которые смогут заполнить нишу среди «страховых» плодовых косточковых культур, дополнив уже имеющийся сортимент. Ускорить этот процесс практически невозможно без применения культуры *in vitro*. В связи с этим, в задачу данных исследований входило выявление наиболее благоприятных сроков изоляции зародышей сортов вишни кислой и гибридов ее с черешней для их активного развития и роста *in vitro*. Анализ литературных источников и полученных в настоящем исследовании результатов позволяет заключить, что сроки изоляции зародышей для ввода в культуру *in vitro* играют очень важную роль для процесса дальнейшего успешного культивирования. В связи с разнотечием таких сроков предложена «точка отсчета» – дата оплодотворения (опыления), а при свободном опылении – массовое цветение. Приведены параметры (высота и ширина) семени вишни в зависимости от срока опыления. Вместе с семядолями, зародыши сортов вишни обыкновенной 14-го дня своего развития соответствуют размерам от $1,2 \times 0,4$ мм до $1,6 \times 1,0$ мм и, при нормальном оплодотворении, к 28-30-у дню увеличиваются в своем размере от $6,5 \times 5,1$ мм до $7,2 \times 6,3$ мм в среднем. В тоже время, семя с зародышем гибридных сортов вишни (дюков) достигает более высоких значений: $11,3 \times 8,1$ мм. При вводе в культуру зародышей вишни следует ориентироваться на их размер, а также на срок, прошедший от опыления. Выявлено, что сроки изоляции, как ранние, на 14-19-й день, так и поздние, на 44-52-й день, отрицательно влияют на развитие зародышей: они останавливаются в развитии, и, при этом, количество полученных сеянцев снижается. Экспериментально доказано, что наиболее оптимальными сроками забора плодов для выращивания гибридов вишни *in vitro* является период с 28-го по 32-й день после опыления цветков: активное развитие у них наблюдали на 10-15-й день в пробирках, и большинство из них (83-85%) начали прорастать через 40 дней (на 39-47-й день после ввода в культуру *in vitro*). В целом это приводит к эффективности проводимой гибридизации и ускорению получения сеянцев в тот же год.

Ключевые слова: зародыши, вишня, сроки изоляции, развитие, инфицированность, проростки, *in vitro*, культивирование.

Для цитирования:

Коваленко Н.Н., Поливара Н.В. Влияние сроков изоляции зародышей на выход сеянцев сортов вишни обыкновенной при культивировании *in vitro*. *Биотехнология и селекция растений*. 2021;4(1):25-35. DOI: 10.30901/2658-6266-2021-1-03

Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. **Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.** **Дополнительная информация.** Полные данные этой статьи доступны <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-1-03> **Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы. Все авторы одобрили рукопись. Конфликт интересов отсутствует.**

Благодарности: Работа выполнена с использованием коллекции генетических ресурсов растений ВИР (VIR Collections of Plant Genetic Resources) в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0662-2019-0004 «Коллекции вегетативно размножаемых культур (картофель, плодовые, ягодные, декоративные, виноград) и их диких родичей ВИР – изучение и рациональное использование».

EFFECT OF THE TIMING OF EMBRYO ISOLATION ON THE OUTPUT OF SEEDLINGS OF SOUR CHERRY VARIETIES WHEN CULTIVATED *IN VITRO*

N.N. Kovalenko*, N.V. Polivara

Krymsk Experiment Breeding Station of VIR, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources,
12 Vavilova Street, Krymsk 353384, Russia;

* ✉ kross67@mail.ru

The breeders are faced with the task of the fastest breeding of sour cherry (*Prunus cerasus* L) varieties, which will be able to fill a niche among the insurance stone fruit crops, complementing the existing assortment. It is practically impossible to speed up this process without the use of *in vitro* culture. In this regard, the purpose of the present study was to identify the most favorable timing for isolating embryos of sour cherry varieties and hybrids with sweet cherry for embryos active development and growth *in vitro*. Analysis of the literature data and the results obtained in this study allows a conclusion that the timing of embryos isolation for their introduction into *in vitro* culture plays a very important role for the entire breeding process. Due to the discrepancy in defining the timing, a certain starting point is proposed, which is the date of fertilization (artificial pollination), or mass flowering in the case of free pollination. The parameters (height and width) of sour cherry seeds, which depend on the period of pollination, are given. Together with the cotyledons, the embryos of sour cherry varieties on the 14th day of their development correspond to sizes from 1.2×0.4 mm to 1.6×1.0 mm and, in the case of normal fertilization, increase in size from 6.5×5.1 mm to 7.2×6.3 mm by day 28-30, on an average. At the same time, the seed with the embryo of hybrid sour cherry varieties (dukes) reaches higher values, e.g., 11.3×8.1 mm. When introducing cherry embryos into culture, one should focus on their size, as well as on the period that has passed from pollination. It was found that the periods of isolation, both early on day 14-19 and late on day 44-52, negatively affect the development of embryos: they stop their development, and the number of the obtained seedlings decreases. It has been experimentally proven that the most optimal timing of fruit picking for growing cherry hybrids *in vitro* is the period from day 28 to 32 after pollination of flowers: active development was observed in them on days 10-15 in test tubes, and most of them (83-85%) began to germinate 40 days later (on day 39-47 after the introduction into *in vitro* culture). In general, this leads to the efficient hybridization and accelerated obtaining of seedlings in the same year.

Key words: embryos, sour cherry, isolation time, development, infection rate, seedlings, *in vitro*, cultivation.

For citation:

Kovalenko N.N., Polivara N.V. Effect of the timing of embryo isolation on the output of seedlings of sour cherry varieties when cultivated *in vitro*. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2021;4(1):25-35. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2021-1-o3

Financial transparency. The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. Additional information.

Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2021-1-o3> **The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer. All authors approved the manuscript. No conflict of interest.**

ORCID ID:

Kovalenko N.N. <https://orcid.org/0000-0002-5287-7635>

УДК 634.233:581.143.6

Поступила в редакцию: 17.01.2021

Принята к публикации: 21.03.2021

Acknowledgments: The work was carried out using the VIR collections of plant genetic resources in the framework of the State Assignment according to the Thematic Plan of VIR, Project No. 0662-2019-0004 "VIR collections of vegetatively propagated crops (potato, fruit, berry, ornamental crops, grapes) and their wild relatives; their study and rational utilization".

Введение

Вишня обыкновенная *Prunus cerasus* L.¹ – ценная, очень распространенная плодовая культура в России. Ее сорта занимают особое место в современном садоводстве и, наряду с сортами черешни (*Prunus avium* L.¹), составляют отдельное сообщество, имеющее свою зону возделывания, как в любительских, так и в промышленных садах.

Почвенно-климатические условия Краснодарского края позволяют возделывать практически все плодовые косточковые культуры. Но при экстремальных условиях климата большинство из них, таких как персик, абрикос, черешня, остаются без урожая, а сорта вишни плодоносят, благодаря чему могут занять место среди «страховых» (Zaremuk, 2010). К сожалению, в данное время площади занятые вишней значительно сокращены, что связано с отсутствием сортов, обладающих необходимыми признаками для возделывания: устойчивостью к основным вредоносным заболеваниям, крупноплодностью и урожайностью. В связи с этим селекция на создание более продуктивных скороплодных и устойчивых сортов вишни продолжается во многих научных учреждениях, в том числе и на Крымской опытно-селекционной станции – филиале ВИР (Eremin et al., 2009; Kolesnikova, 2014; Yushev, 2012).

Гибридное потомство от внутривидовых скрещиваний, не говоря уже о скрещиваниях межвидовых, в которые вовлечены представители сортов вишни и сортов черешни, в полевых условиях получить очень сложно, а зачастую и невозможно из-за постгамной несовместимости. Получение и культивирование гибридных зародышей вишни в условиях *in vitro* дает возможность ускорить появление новых гибридных форм (Gusev, 2012; Kovalenko, Gladkih, 2019).

Современная биотехнология растений этого направления пополняется новыми знаниями о составе применяемых искусственных питательных сред (Zdruikovskaya-Richter, 1964; Plaksina et al., 2013; Kukharchik et al., 2006; Asanica et al., 2016) и обеззараживающих препаратов, позволяющих снизить уровень инфицированности зародышей (Podorozhnyi, 1998; Kovalenko, Polivara, 2020; Plaksina, 2016). При всей значимости вышеприведенных задач, решаемых биотехнологами в процессе работы, выход селекционного материала оказывается невысоким. К объективным причинам низкого выхода сеянцев следует отнести не только инфицированность возбудителями различных болезней, но и поражение семян семяедами (Kovalenko, Gladkih, 2020). Поэтому в опытах по куль-

тивированию зародышей *in vitro* очень важна предварительная оценка качественного состояния семян.

Для успешного культивирования зародышей *in vitro* большое значение имеет сформированность семени, что напрямую зависит от эффективности процесса оплодотворения (Bradbury, 1925; Roberts, 1925; Kamlah, 1928; Kovalenko, Gladkih, 2020). Эти факторы являются решающими при определении как сроков изоляции плодов, так и самих зародышей на различных стадиях их развития. Дифференцировка зародыша на почечку, корешок и семядоли происходит через 50-55 дней после оплодотворения (Balla, Brozik, 1996; Plaksina et al., 2013). Поэтому из семян, имеющих возраст до 30-ти дней после опыления, очень редко удастся получить проростки.

Этапам эмбриогенеза соответствуют характерные морфологические изменения, связанные с воздействием внешних условий и самого оплодотворения (Spitsin, 1998; Plaksina, 2016; Woo, Wetzstein, 2008). Как считают многие исследователи, подобные изменения вполне можно объединить в четкие стадии развития (Zdruikovskaya-Richter, 1964; Balla, Brozik, 1996; Dulic et al., 2016; Plaksina, 2016). В связи с этим, вопрос о наиболее оптимальных сроках изоляции завязи и последующего ввода зародыша в культуру *in vitro* является до сих пор неразрешенным, и мнения различных авторов по этому вопросу неоднозначны. Так, в своих работах А.И. Здруйковская-Рихтер (Zdruikovskaya-Richter, 1962; 1964) считает, что нужно производить срез плодов черешни и персика при достижении зародышем 1/3-1/2 объема семени, поскольку, если зародыш занимает меньший объем (1/5-1/4 части полости) – проростки погибают на ранних стадиях их развития. Существует и другое мнение по этому поводу. М.С. Чеботарева считает, что для культивирования зародышей вишни наиболее благоприятным является срок их изоляции на ранней стадии развития – на 19-22-й день, к этому периоду относят стадии развития зародыша «сердечко» и «торпеда» (Chebotareva, 1990). Зарубежные ученые, работая с культурой зародышей сортов черешни, показали, что зародыши успешно поддаются культивированию при их вычленении из недозрелых плодов «желто-зеленой» стадии (Kukharchik et al., 2006; Woo, Wetzstein, 2008; Dulic et al., 2016; Asanica et al., 2016).

Основная часть подобных работ для рода *Cerasus* Mill.¹ (*Prunus* L.) посвящена черешне (Zdruikovskaya-Richter, 1964; Spitsin, 1998; Balla, Brozik, 1996; Asanica et al., 2016; Dulic et al., 2016; Kovalenko, Gladkih, 2020), а также вишне степной (Plaksina et al., 2013; Plaksina, 2016), хотя есть работы, в которых исследованы и другие виды вишни (Chebotareva, 1990; Kukharchik et al., 2006;

¹ От Редактора: Авторский вариант латинского названия вишни обыкновенной *Cerasus vulgaris* Mill. был частично заменен на *Prunus cerasus* L., поскольку является не используемым в международной литературе синонимом последнего. Существуют два основных мнения о систематическом положении видов вишни: некоторые исследователи принимают их в составе подрода рода *Prunus*, в то время как другие исследователи принимают виды вишни в качестве самостоятельного рода *Cerasus* Mill. (Yandovka, 2015). *Cerasus avium* (L.) Moench является синонимом *Prunus avium* L.

Editor's note: The author's version of the Latin name *Cerasus vulgaris* Mill. was partially replaced by *Prunus cerasus* L. as it is a synonym of the latter that is not currently used in international literature. There are two main views on the systematic position of cherry species: several researchers treat them as part of the subgenus *Prunus*, and the other consider cherry species as a separate genus (Yandovka, 2015). *Cerasus avium* (L.) Moench is a synonym of *Prunus avium* L.

Gusev, 2012;). Во всех имеющихся исследованиях на данный вопрос было обращено очень мало внимания, и о результатах опытов судили почти исключительно по количеству полученных сеянцев. До настоящего времени не было установлено число дней, которое должно пройти после оплодотворения, и какими должны быть оптимальные условия для изоляции и успешного культивирования зародыша. Важными факторами при этом являются размер зародыша и сроки его высадки на искусственную питательную среду, что, в свою очередь, зависит от родовой, видовой и сортовой принадлежности растений рода *Cerasus* Mill. (*Prunus* L.)¹

Цель исследования заключалась в оптимизации процесса выращивания сеянцев сортов вишни в культуре *in vitro*, в связи с чем первоочередной задачей было определить наиболее благоприятные сроки изоляции зародышей для их активного роста и развития в культуре.

Материалы и методы

Исследования проводили в лаборатории биотехнологии и биохимии Крымской ОСС филиала ВИР (2018-2020 годы) с использованием ранее опубликованных методов (Zdruikovskaya-Richter, 1962; Dzhigadlo et al., 2005)

и методик, разработанных нами (Kukharchik et al., 2006; Kovalenko et al., 2020).

Учитывали время массового цветения, а также дату опыления. Время изоляции зародышей в опытах соответствовало срокам в 19, 23, 28, 32, 36, 40, 44, 48 и до 52-х дней с момента опыления.

Для стерилизации плодов, косточек и семян использовали мыльный раствор, последующее ополаскивание водой и обработку хлорсодержащим водным раствором (Део Хлор®, Део, Россия). Скарификацию и стерилизацию ядра косточки от поверхностной сапрофитной микрофлоры производили двухфазным способом (Kovalenko, Polivara, 2020). При этом в первой фазе использовали водный раствор Део Хлор® (3,4 г на 210 мл воды с экспозицией 8 мин., с последующей 3-х кратной промывкой стерильной дистиллированной водой по 5 минут), а во второй фазе использовали перекись водорода (3%, в течение трех минут).

Зародыши культивировали в стерильных пробирках размером 21,0 × 140 мм. В опытах использовали агаризованную питательную модифицированную среду на основе прописи Мурасиге и Скуга, 1962 (Murashige, Skoog, 1962), дополненную фитогормонами и витаминами, состав которой представлен в таблице 1.

Таблица 1. Состав использованный в работе модифицированной питательной среды Мурасиге и Скуга (1962) (M&S)

Table 1. Composition of the Murashige and Skoog (1962) (M&S) modified nutrient medium used in this study

Название реактива / Reagent name	Единица измерения / Measure unit	Количество реактива / Reagent quantity
Макросоли	по прописи M&S	
Хелат железа	по прописи M&S	
Микроэлементы	по прописи M&S	
Фитогормоны		
6-Бензиламинопурин (6-БАП)	мг/л	0,5
гибберелловая кислота (ГК)		0,2
индолилмасляная кислота (ИМК)		0,2
Витамины		
тиамин (В ₁)	мг/л	0,5
пиридоксин (В ₆)		0,5
никотиновая кислота (РР)		0,5
аскорбиновая кислота (С)		1,0
Другие компоненты		
сахароза	г/л	30
агар-агар		7,0
рН		5,6 ÷ 5,8

С целью определения оптимальных условий изоляции зародышей для культуры *in vitro* были взяты 12 коллекционных сортообразцов различного генетического происхождения, а именно сорта вишни обыкновенной: 'Тургеневка', к-25278; 'Любская', к-18335; 'Шишевская', к-5536; 'Шахзада', к-43792. Были также исследованы гибриды вишни с черешней: 'Игрушка', к-34138; 'Чудо Вишня', к-42141; 'Эрди Крупноплодная', к-16826А; 'Красавица Ребокура', к-11910, 'Превосходная Веняминова', к-42272; 'Южная Красавица', к-24010; 'Малышка', к-26395; 'Эффективная', к-43794. Зародыши высаживали в стерильных условиях ламинар-боксов (ВЛ-12, Tehnosom, Россия). Культивирование зародышей осуществляли в стационарных условиях 16-ти часового фотопериода в специализированном светозале в пробирках, помещенных в штативы, установленные на стеллажах. Повторность опытов была двукратная, по 20 пробирок с одним зародышем в каждой из них. Для освещения использовали лампы дневного света ЛД-40 (Лисма, Россия), по две лампы на 1 м², которые создавали интенсивность светового потока 3 тысячи люкс. Температура воздуха в светозале поддерживалась на уровне +24±1°C.

Для анализа достоверности влияния факторов «сорт» и «срок ввода в культуру» проводили дисперсионный анализ с использованием статпакета Statistica 13.3.

Результаты и обсуждение

Многолетние наблюдения за развитием цветковых почек, фенофазами (ФФ) цветения и созревания плодов вишни в климатических условиях Предгорной зоны Краснодарского края – территория Крымской ОСС фили-

ала ВИР – позволили установить, что условия окружающей среды в период раскрытия цветковых почек и цветения влияют на эффективность оплодотворения. Благоприятными для оплодотворения являются повышенная температура воздуха, безветренная и недождливая погода. Результатом успешного оплодотворения является большое количество завязей, однако их опадение на разных стадиях развития приводило к снижению количества зрелых плодов.

Плодоводы всегда уделяли большое внимание изучению причин опадения завязей, однако результаты ранних исследований зачастую остаются без внимания со стороны биотехнологов. Дороти Брэдбери (Bradbury, 1925) выявила, что опадение плодов черешни и вишни происходит в «три волны». Это было подтверждено и работами других исследователей (Crane, 1923; Roberts, 1925). Плоды, опадающие в первые «две волны», легко отличимы от остающихся на ветках дерева (до третьей волны или до их созревания). Анатомические исследования таких плодов показывают, что опыление не произошло вследствие слабого роста пыльцевой трубки или дегенерации яйцеклетки. Такие плоды опадают вместе с чашечкой сразу после цветения. Второе опадение плодов обусловлено абортивностью зародышевого мешка или гибелью зародыша, что приводит к остановке развития плодов и дальнейшему их «высыханию». Третья волна опадения плодов связана с абортацией зародыша и эндосперма на более поздней стадии развития из-за недостаточного питания. Перечисленные выше три фракции плодов не представляют интерес для селекционера-биотехнолога, поскольку не содержат зародышей, пригодных для культивирования *in vitro*.



a



b

Рис. 1. Дефектность семян вишни во время их роста, в результате (а) неполноценного опыления, (б) вследствие повреждения семяедом (фотографии 2019 года)

Fig. 1. Defects of growing sour cherry seeds resulting from (a) imperfect pollination, (b) seed-eater damage (photos from 2019)

Опадание плодов, связанное с дефективностью яйцевого аппарата или несовместимости с пыльцой, заканчивается через 2-3 недели после опыления, или на 14-20-й день от массового цветения. Именно к этому периоду приурочен установленный нами первый срок, 19-й день, для съема плодов и введения зародышей в культуру *in vitro*.

Анатомические исследования развития плодов этого периода показали, что внутри ядра косточки могут находиться кладки и личинки семяеда (Kovalenko, Gladkikh, 2020). Стерилизация плодов и косточек приводит к гибели вредителей, однако вызванные семяедами повреждения зародышей и семядолей (рис. 1) являются причиной снижения выхода сеянцев в культуре *in vitro*.

На первом этапе работ по определению оптимальных сроков ввода зародышей в культуру *in vitro*, начиная с 19-го дня после опыления, и далее (на 23, 28, 32 и 36-й дни), в связи с большим объемом опытов, было использовано пять сортов, представленных в таблице 2. Дисперсионный анализ показал, что между сортами не было достоверных различий по проценту проросших зародышей (уровень значимости различий $p=0,887$).

Результаты опытов по срокам изоляции зародышей напрямую связаны с периодами опадения плодов и количеством проросших зародышей *in vitro*. Плоды вишни, собранные на 28-32-й день после оплодотворения, имели семена с более жизнеспособными зародышами, и выход сеянцев в этих вариантах был более высоким (в среднем по сортам 23,2% на 28-й день и 48,9% на 32-й день), чем на 19-23-й день (2,6 и 14,7%, соответственно). Процент

проросших зародышей достоверно различался между сроками введения в культуру *in vitro* ($p=0,000$), все сроки отличаются друг от друга достоверно ($p<0,023$). Введенные в культуру *in vitro* зародыши на 19-й и на 23-й день после опыления в своем большинстве были неполноценными (неоплодотворенные или частично оплодотворенные), что, к сожалению, в дальнейшем отрицательно влияло на выход сеянцев.

Плоды вишни, отобранные для эксперимента на стадии технической и полной зрелости (на 44-48-й и на 52-55-й день, соответственно), имели хорошо сформированные семядоли и зародыши («выполненное семя»), или же семядоли были «сухими» («пустое семя»).

Для селекции важно количество полученных сеянцев, что непосредственно зависит от активного развития самих зародышей. Развитие зародышей может начаться уже через две недели после ввода их в культуру *in vitro*, или же в период от восьми месяцев культивирования до одного года. Поэтому возможно получать сеянцы (микрорастения) уже в год опыления, или только через год-полтора. В таблице 3 показано влияние сроков изоляции зародышей вишни на их развитие в культуре *in vitro*. Поскольку различий между сортами не было, то мы отобрали по два сорта на каждый срок. Дисперсионный анализ показал, что срок изоляции достоверно повлиял на все изученные параметры развития: количество дней до начала развития первых зародышей ($p=0,000$), последних зародышей ($p=0,000$); процент проросших зародышей ($p=0,000$), инфицированных зародышей ($p=0,018$), оставшихся в покое ($p=0,000$).

Таблица 2. Влияние сроков изоляции зародышей вишни на выход проростков в культуре *in vitro*, 2018-2019 гг.

Table 2. Influence of the timing of sour cherry embryos isolation on the yield of seedlings in *in vitro* culture, 2018-2019

Сорт/ Variety	Доля проросших зародышей, %, изолированных в определенный срок (указан день после опыления)/ Fraction of germinated embryos, %, isolated within a certain period (date after pollination)				
	19	23	28	32	36
‘Любская’	5,0	17,0	25,5	56,5	45,0
‘Шишевская’	0,0	12,0	21,0	44,0	35,0
‘Шахзада’	3,0	14,5	22,0	39,0	31,0
‘Тургеневка’	4,0	17,0	27,5	59,0	51,0
‘Игрушка’	1,0	13,0	20,0	46,0	39,0

Зародыши, введенные в культуру *in vitro* на 28-32-й день, начали развиваться на 10-15-й день в условиях светозала; в случае введения в культуру на 36-44-й день зародыши стали развиваться на 18-23-й день, а зародыши 48-52-го дня – через 25-34 дня. Активное их развитие происходит в течение 39-47-и дней (зародыши, имеющие срок посадки на культуральную среду 28-32-й

день) и 80-93 дня в случае срока посадки на 48-52-й день. Остальная часть зародышей (от 11 до 38 %) перешла в стадию покоя.

Результаты опытов 2018-2019 годов по выявлению активности прорастания в культуре *in vitro* зародышей из семян сортов вишни, в зависимости от сроков изоляции зародышей, представлены на рисунке 2.

Таблица 3. Влияние сроков изоляции зародышей вишни на их развитие в культуре *in vitro*, 2019-2020 гг.

Table 3. Influence of the timing of sour cherry embryos isolation on their development in *in vitro* culture, 2019-2020

Сорт вишни/ Variety of sour cherry	Количество дней до начала развития зародышей/ Number of days prior to the start of embryo development		Доля зародышей (%), от введенных в культуру <i>in vitro</i> / Fraction of embryos (%) of introduced <i>in vitro</i>		
	первых/ first	последних/ last	развившихся/ developed	инфицированных/ infected	в покое/ dormant
ввод в культуру на 28-й день					
‘Любская’	13,0	47,0	80,0	6,0	14,0
‘Шишевская’	15,0	45,0	84,0	4,0	12,0
ввод в культуру на 32-й день					
‘Тургеневка’	10,0	39,0	86,0	3,0	11,0
‘Шахзада’	12,0	42,0	85,0	2,0	13,0
ввод в культуру на 36-й день					
‘Чудо Вишня’	19,0	49,0	76,0	5,0	19,0
‘Игрушка’	18,0	50,0	72,0	11,0	17,0
ввод в культуру на 40-й день					
‘Эффективная’	21,0	69,0	69,0	5,0	26,0
‘Эрди Крупноплодная’	20,0	60,0	71,0	5,0	24,0
ввод в культуру на 44-й день					
‘Красавица Ребокура’	23,0	73,0	65,0	7,0	28,0
ввод в культуру на 48-й день					
‘Игрушка’	25,0	80,5	58,5	11,0	30,0
‘Малышка’	25,0	80,0	59,0	10,0	31,0
ввод в культуру на 52-й день					
‘Превосходная Веняминова’	30,0	89,0	50,0	13,0	37,0
‘Южная Красавица’	34,0	93,0	44,0	18,0	38,0

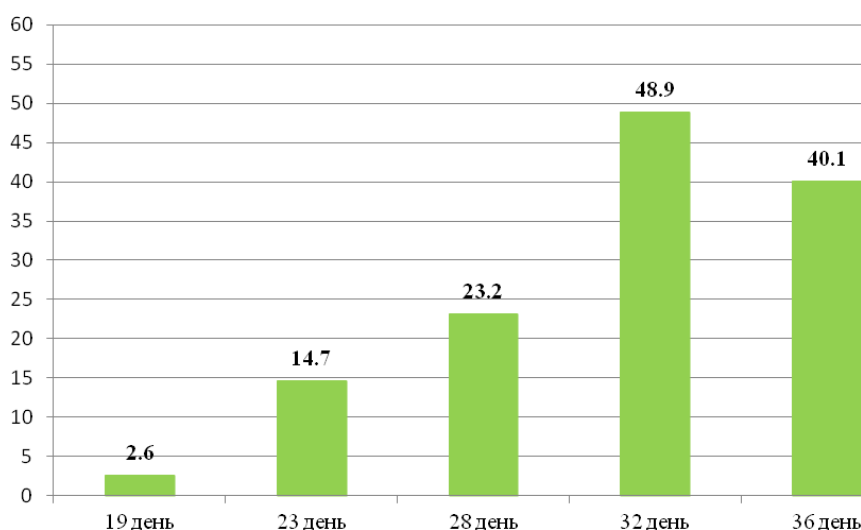


Рис. 2. Активность прорастания зародышей сортов вишни в зависимости от сроков их введения в культуру *in vitro*, в среднем за 2018-2019 гг.

Fig. 2. Germination activity of embryos of sour cherry varieties, depending on the timing of introduction into *in vitro* culture, average for 2018-2019

Как видно на представленной диаграмме, количество проросших зародышей на однотипной питательной искусственной среде в одинаковых условиях напрямую зависит от срока их введения в культуру *in vitro*. При этом количество развитых сеянцев составило 2,6% от общего количества зародышей, высаженных на 19-й день изоляции. Далее было отмечено постепенное увеличение значений этого показателя (14,7%, 23,2%), достигшего 48,9% на 32-й день. Была выявлена прямая зависимость значений этого показателя от срока изоляции зародыша, но она

сохраняется только до срока 36-й день со времени опыления. С этого периода наблюдается спад активности прорастания зародышей *in vitro* до 40,1% (см. рис. 2).

В дальнейших исследованиях введение зародышей в культуру *in vitro* начинали только с 28-го дня от момента опыления цветков, но диапазон сроков изоляции плодов был увеличен до 52-х дней с интервалом в четыре дня. Полученные данные показали, что наиболее оптимальное время для вычленения зародыша – это 32-й день (рис. 3).

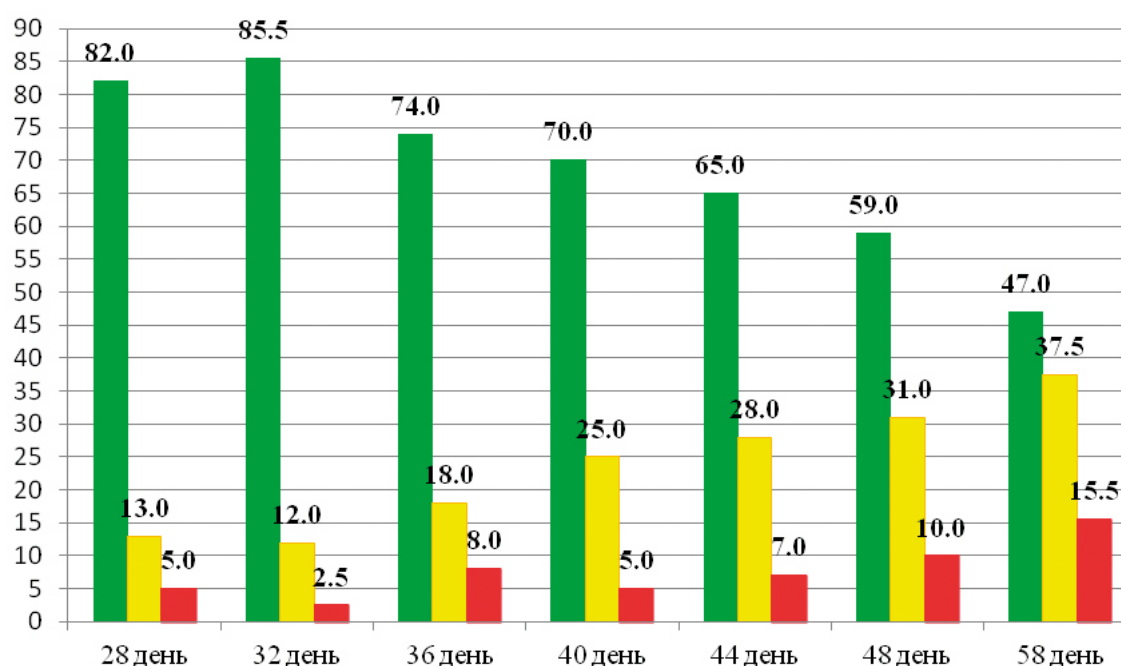


Рис. 3. Зависимость развития проростков от сроков введения в культуру *in vitro* зародышей вишни, в среднем за 2019-2020 гг.

Примечание:

процент зародышей

- - развившихся
- - в покое
- - инфицированных

Fig. 3. Dependence of seedling development on the timing of sour cherry embryos introduction into *in vitro* culture, average for 2019-2020

Note:

Percentage of embryos

- - developed
- - at rest
- - infected

Семена из зрелых плодов (на 52-й день и более), имея хорошо развитые семядоли и зародыши, могут войти в «стадию покоя» и не показать быстрого развития *in vitro*. Количество инфицированных зародышей также было минимальным (2,5%) в этот период. Затем наблюдается постепенный спад активности развития проростков. Доли сеянцев от введенного в культуру *in vitro* от числа зародышей составили 74,0; 70,0; 65,0; 59,0 и 47,0% в разные сроки, соответственно. Инфицированность зародышей оставалась примерно в одних и тех же пределах 2,5÷8% до срока посадки от 48-го до 52-го дня от опыления. В этом варианте опыта (48-й–52-й день от опыления) процент семян, пораженных инфекцией, увеличился до 10,5-15,5%.

Примененный в 2019-2020 годах двухфазный способ обеззараживания плодов, косточек и семян вишни (перед культивированием), заключающийся в последовательном воздействии раствора хлора и перекиси водорода (Kovalenko, Polivara, 2020), позволил увеличить выход здоровых зародышей и снизить их инфицированность.

Произведенные промеры показали, что на 14-й день своего развития зародыши в полноценно сформированных плодах были очень маленькие и вместе с семядолями достигали размеров от 1,2 до 1,6 мм в высоту и от 0,4 до 1,0 мм в ширину, а к 28-30-му дням семя значительно увеличивалось в размерах, достигая 6,5-7,2 мм в высоту и 5,1-6,3 мм в ширину (рис. 4).

В сроки сбора плодов вишни, оптимальные для инициации культуры *in vitro* (30-32-й день), семя имеет широкоовальную форму и заключено в плотную семенную оболочку с параметрами в среднем $8,3 \times 6,3$ мм. В те же сроки, дюки (гибриды вишни и черешни) имеют более крупные косточку и семя, последнее занимает практически всю полость косточки. Размер косточки в этот период развития у гибридов составляет в среднем $11,3 \times 8,1$ мм. Анализ морфологических признаков плодов вишни, их зависимости от срока изоляции зародышей для ввода их в культуру *in vitro* и периодов прорастания зародышей свидетельствует в пользу изоляции зародыша из семени более зрелого плода, то есть на 28-32-й день, когда семя занимает большую часть полости косточки, а не на 19-23-й день.

Более поздние сроки посадки зародышей на питательную среду также возможны. Однако, если зародыши вводить в культуру на 36-48-й день, то, в таком случае, они часто входят в стадию покоя, и до начала их развития может пройти от полугода до года. При этом наблюдается потеря большинства сеянцев из-за внутренней инфицированности, что в случае работы с гибридами, практически сводит на нет усилия, направленные на их получение.

В целом, необходимо отметить, что эффективность работы по созданию селекционного фонда вишни обыкновенной и её гибридов с черешней (дюков) можно повысить путем использования культуры зародышей *in vitro*.

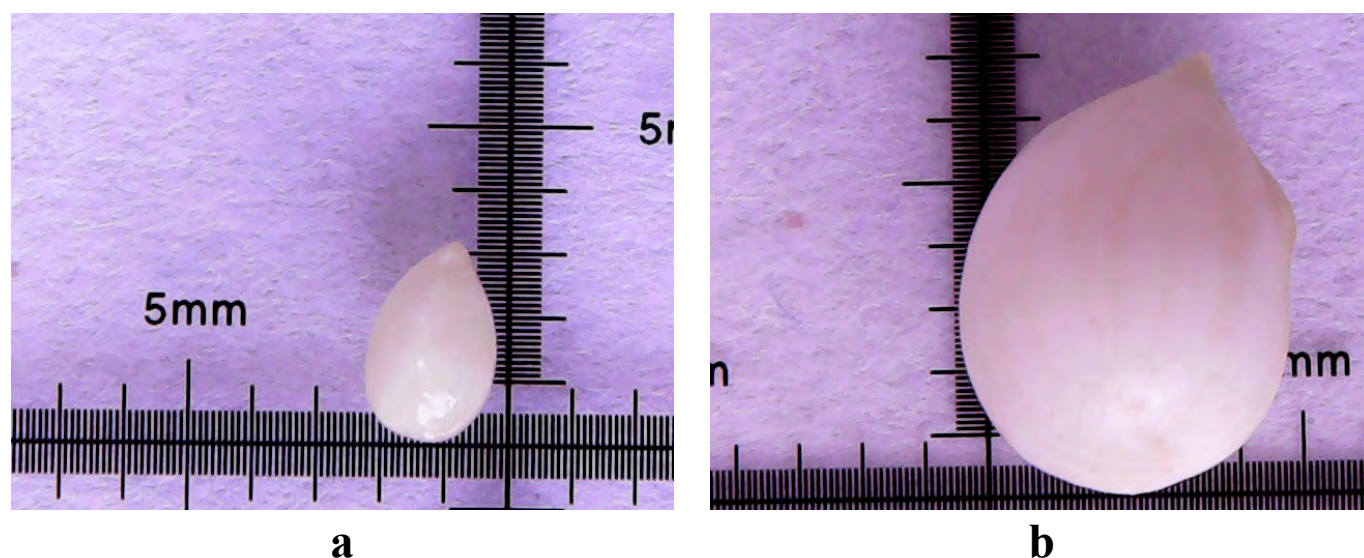


Рис. 4. Изолированное семя сортов вишни обыкновенной: (а) на 25-й и (b) на 30-й день развития, 2019 г.

Fig. 4. Isolated seed of sour cherry varieties: (a) 25th and (b) 30th day of development, 2019

Заключение

При выведении новых сортов вишни с использованием культуры *in vitro* остро стоял вопрос о сроках ввода зародышей в культуру. Анализ данных литературы и опыты по изоляции зародышей из семян на различных сроках их развития позволили выяснить причины плохого развития зародышей. К числу таких причин следует отнести частичное или неполное оплодотворение, а также поражение семядами.

В связи с разнотечением сроков ввода зародышей вишни в культуру *in vitro* и для удобства регистрации данных при работе с культурой предложена «точка отсчета» – дата оплодотворения (опыления), а при свободном опылении – массовое цветение.

Приведены параметры (размеры) семени вишни в зависимости от срока, отсчитываемого от даты опыления: на 14-й и 28-й день развития семян.

Зародыши, высаженные на модифицированную среду Мурасиге и Скуга (1962) с добавлением биологически активных веществ, имели различный период до начала их развития в культуре *in vitro*. Активное развитие (на 10-15-й день культивирования) наблюдали у зародышей вишни, введенных в культуру на 28-32-й день после опыления, большинство зародышей в этой выборке начали прорастать в течение 39-47-и дней культивирования.

Нами установлено, что сроки прорастания зародышей семян вишни при культивировании *in vitro* прямо пропорциональны срокам их введения в культуру, отсчитываемым от момента оплодотворения: чем раньше введены в культуру, тем раньше начинают прорастать, то есть, если зародыши введены в культуру *in vitro* на 36-44-й день от момента оплодотворения, то их прорастание на искусственной среде произойдет в период от 18 до 23-х дней от начала культивирования; зародыши изолированные из семян на 48-55-й день – прорастали через 25-34 дней культивирования. В течение 80-и – 93-х дней культивирования происходило массовое прорастание зародышей в культуре *in vitro*, при этом часть зародышей (от 11 до 37%) входило в стадию покоя.

Нами показано, что дата оптимального срока ввода в культуру *in vitro* зародышей разных сортов вишни соответствует периоду от 28-го до 32-го дня после оплодотворения цветков. Развитие зародышей наблюдается уже на 10-15-й день, большинство из них (83-85% от числа высаженных), выходят из покоя через 39-47 дней и начинают активный рост.

Таким образом, сроки изоляции зародышей в значительной степени влияют на выход сеянцев сортов вишни обыкновенной при культивировании их *in vitro*. Для дальнейшей успешной работы в этом направлении следует брать зародыши на 28-32-й день после опыления, что в случае работы с гибридами приводит к высокой эффективности их получения и ускорению селекционного процесса минимум на 1,5 года.

References/Литература

- Asanica A., Tudor V., Plopa C., Sumedrea V., Peticila A., Teodorescu R., Tudor V. *In vitro* embryo culture of some sweet cherry genotypes. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2016;10:172-177. DOI: 10.1016/j.aaspro.2016.09.049
- Balla I., Brozik S. Embryo culture of sweet cherry hybrids. *Acta Horticulturae*. 1996;410:385-386. DOI: 10.17660/Acta Horticulturae.1996.410.60
- Bradbury D. Notes on the dropping of immature sour cherry fruits. In: *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* (1924-25). The American Society for Horticultural Science; 1925. p.105-110.
- Crane M.B. Report on tests of self-sterility and cross-incompatibility in plums, cherries and apples at the John Innes Horticultural Institution.-II. *Journal of Pomology and Horticultural Sciences*. 1923;3(2):67-84. DOI: 10.1080/03683621.1923.11513252
- Chebotaeva M.S. *In vitro* culture of germs of the genus *Cerasus* Mill. in breeding for coccomycosis resistance. *Nauchno-tekhnicheskiy Bulletin VIR = Scientific and Technical Bulletin of VIR*. 1990;204:26-30. [in Russian] (Чеботарева М.С. Культура зародышей *in vitro* рода *Cerasus* Mill. в селекции на устойчивость к коккомикозу. *Научно-технический бюллетень ВИР*. 1990;204:26-30).
- Dulić J., Ognjanov V., Ercisli S., Miodragović M., Barać G., Ljubović M., Dorić D. *In vitro* germination of early ripening sweet cherry varieties (*Prunus avium* L.) at different fruit ripening stages. *Erwerbs-Obstbau* 2016;58:113–118. doi: 10.1007/s10341-016-0265-y
- Dzhigadlo G.V., Dzhigadlo M.I., Golyshkina L.V. Methodological recommendations on the use of biotechnological methods in work with fruit, berry and ornamental crops (Metodicheskie rekomendatsii po ispolzovaniyu biotekhnologicheskikh metodov v rabote s plodovymi, jagodnymi i dekorativnymi kulturami). Orel; 2005. [in Russian] (Джигадло Г.В., Джигадло М.И., Голышкина Л.В. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Орел; 2005).
- Eremín G.V., Alekhina E.M., Kruzhkov A.V., Eremina O.V. Catalog of Certificates of Donors and Sources of Breeding-significant Traits of Cherries and Sweet Cherries (Katalog pasportov donorov i istochnikov selektsionno-znachimyykh priznakov vishni i chershni). Krymsk; 2009. [in Russian] (Еремин Г.В., АLEXина Е.М., Кружков А.В., Еремина О.В. Каталог паспортов доноров и источников селекционно-значимых признаков вишни и черешни. Крымск; 2009).
- Gusev D.A. Application of the *in vitro* method for obtaining cherry and micro-cherry polyploids: (Primeneniye metoda *in vitro* dlya polucheniya poliploidov vishni i mikrovishni). In: *Stone fruits in horticulture and ornamental gardening (Kostochkovye kul'tury v sadovodstve i dekorativnom ozelenenii. Sb. materialov IV Vserossiiskogo syezda sadovodov): Proceedings of IV All-Russian Congress of Gardeners*; Chelyabinsk; 2012. p.39-42. [in Russian] (Гусев Д.А. Применение метода *in vitro* для получения полиплоидов вишни и микровишни. В кн.: *Косточковые культуры в садоводстве и декоративном озеленении: Сборник материалов IV Всероссийского съезда садоводов*. Челябинск; 2012:39-42).
- Kamlah H. Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse bei Kirschen- und Birnensorten. *Kühn-Archiv*. 1928;19. [In German]
- Kolesnikova A.F. Breeding of common cherries in the past and present (Seleksiya vishni obyknovennoy v proshlom i nastoyashchem). Orel; 2014. [in Russian] (Колесникова А.Ф. Селекция вишни обыкновенной в прошлом и настоящем). Орел; 2014).
- Kovalenko N.N., Gladkih S.V. *In vitro* cultivation of the embryos of hybrid forms of early-ripening sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(6):765-771. [in Russian] (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

- Kovalenko N.N., Polivara N.V. Improvement of the method of obtaining the genus *Prunus* L. saprophytic microflora free embryos for *in vitro* culture. *Fruit growing and viticulture of South of Russia*. 2020;63(3):107-120. [in Russian] (Коваленко Н.Н., Поливарова Н.В. Совершенствование способа получения свободных от сапрофитной микрофлоры зародышей рода *Prunus* L. для культуры *in vitro*. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2020;63(3):107-120). DOI: 10.30679/2219-5335-2020-3-63-107-120
- Kovalenko N.N., Polivara N.V., Gladkih S.V. Obtaining interspecific hybrids of stone fruit crops by biotechnological methods. Scientific Methodological Guide (Poluchenie mezhvidovyyh gibridov kostochkovykh plodovykh kultur biotekhnologicheskimi metodami. Nauchno-metodicheskoye posobie). Krasnodar; 2020. [in Russian] (Коваленко Н.Н., Поливарова Н.В., Гладких С.В. Получение межвидовых гибридов косточковых плодовых культур биотехнологическими методами: научно-методическое пособие. Краснодар; 2020). DOI: 10.30901/978-5-93491-854-6.
- Kovalenko N., Gladkih S. Evaluation of seeds quality in the fruits of cherry varieties (*Cerasus vulgaris* L.) in the process of embryo cultivation *in vitro*. *BIO Web of Conferences*. 2020;25:04002. DOI: 10.1051/bioconf/20202504002
- Kukharchik N.V., Kastritskaya M.S., Pugacheva R.M. A technique for cultivation of isolated cherry and plum embryos (Metodika kultivirovaniya izolirovannykh zarodyshey vishni i slivy). *Fruit growing*. 2006;18(2):157-162. [in Russian] (Кухарчик Н.В., Кастритская М.С., Пугачева Р.М. Методика культивирования изолированных зародышей вишни и сливы. *Плодоводство*. 2006;18(2):157-162).
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology of Plants*. 1962;15:473-497.
- Plaksina T.V., Kulkhanova D.S., Matkova E.Yu. The culture of isolated embryos in breeding of cherry. *Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex*. 2013;7:17-19. [in Russian] (Плаксына Т.В., Кульханова Д.С., Маткова Е.Ю. Культура изолированных зародышей *in vitro* в практической селекции вишни. *Достижения науки и техники АПК*. 2013;7:17-19).
- Plaksina T.V. Embryo culture and multiplication *in vitro* of frutescent cherry (*Prunus fruticosa* Pall.). In: *Proceedings of the VII International Scientific and Practical Conference on Biotechnology as an Instrument for Plant Biodiversity Conservation (physiological, biochemical, embryological, genetic and legal aspects), dedicated to the 30th anniversary of the Biotechnology Department of the Nikitski Botanical Garden; 2016 25 Sep. - 1 Oct.; Yalta. Simferopol; 2016*. p.116. [in Russian] (Плаксына Т.В. Эмбриокультура и микроразмножение *in vitro* вишни степной (*Prunus Fruticosa* Pall.). В кн.: *Материалы VII Междунар. науч.-практ. конф. «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного материала (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты), посвящ. 30-летию отдела биотехнологии Никитского ботанического сада, Ялта, 25 сент.–1 окт. 2016*. Симферополь; 2016. С.116).
- Podorozhnyi V.N. Mercury iodide as a surface-sterilizing substance in the work with tissue culture of fruit plants. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 1998;153:69-72. [in Russian] (Подорожный В.Н. Йодид ртути как поверхностно-стерилизирующее вещество в работе с культурой ткани плодовых растений. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1998;153:69-72).
- Roberts R.H. Pollination and the dropping of apples. *American Fruit Grower*. 1925;45.
- Spitsin I.P. The use of *in vitro* embryo culture in the study of genetics of embryogenesis, seed and fruit formation in some plants of the genus *Cerasus*. In: *The use of biotechnological methods for solving genetic breeding problems: collection of articles and reports. XVIII Michurin Readings; 1997 Oct. 27-29. Michurinsk; 1998*. p.96-98. [in Russian] (Спицин И.П. Использование культуры зародыша *in vitro* в изучении генетики эмбриогенеза, семя- и плодообразования некоторых растений рода *Cerasus*. В кн.: *Использование биотехнологических методов для решения генетико-селекционных проблем: сборник докладов и сообщений XVIII Мичуринских чтений, 27-29 окт. 1997*. Мичуринск; 1998. С.96-98).
- Woo S.M., Wetzstein H.Y. Morphological and histological evaluations of *in vitro* regeneration in *Elliottia racemosa* leaf explants media with thidiazuron. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2008;133:167-172.
- Yandovka L.F. On the systematic status of sour and sweet cherry species (Rosaceae) (Sostoyaniye voprosa o sistematicheskom položezhenii vidov vishni i chereshti (Rosaceae). *Izvestia Herzen University Journal of Humanities & Sciences*. 2015;173:125-132. [in Russian] (Яндовка Л.Ф. Состояние вопроса о систематическом положении видов вишни и черешни (Rosaceae). *Известия Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена*. 2015;173:125-132).
- Yushev A.A. The species and varietal potential of sour cherry genetic stocks at VIR (Vidovoy i sortovoy potentsial vishni genofonda VIR). In: *Stone fruits in horticulture and ornamental gardening (Kostochkovye kultury v sadovodstve i dekorativnom ozelenenii. Sb. materialov IV Vserossiiskogo syezda sadovodov): Proceedings of IV All-Russian Congress of Gardeners; Chelyabinsk; 2012*. p.105-111. [in Russian] (Юшев А.А. Видовой и сортовой потенциал вишни генофонда ВИР. В кн.: *Косточковые культуры в садоводстве и декоративном озеленении: сб. материалов IV Всероссийского съезда садоводов*. Челябинск; 2012. С.105-111).
- Zaremuk R.Sh. Productivity of a variety is the basis of the technology of intensive sour cherry cultivation: problems of intensive gardening. In: *Materials of the expanded meeting of the Academic Council, dedicated to 100th anniversary of the birth of Dr. Agric. Sci. Trusevich Gavriil Vladimirovich: scientific works. Krasnodar; 2010*. p.110-116. [in Russian] (Заремук Р.Ш. Продуктивность сорта – основа интенсивной технологии возделывания вишни: проблемы интенсивного садоводства. В кн.: *Материалы расширенного заседания Ученого совета, посвященного 100-летию со дня рождения д-ра с.х.н. Трусевича Гавриила Владимировича: научные труды*. Краснодар; 2010. С.110-116).
- Zdruikovskaya-Richter A.I. Isolated embryos culture and some other techniques of growing plants *in vitro*: methodological recommendations (Kultura izolirovannykh zarodyshey i nekotoryye drugie priemy vyrashchivaniya rasteniy *in vitro*: metodicheskiye rekomendatsii). Moscow; 1962. [in Russian] (Здруйковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*: методические рекомендации. Москва; 1962).
- Zdruikovskaya-Richter A.I. Embryoculture under artificial conditions as a method of breeding early-ripening varieties of sweet cherry, peach, and pear (Kultura zarodyshey v iskusstvennykh usloviyakh kak metod seleksii ranosozrevayushchikh sortov chereshti, persika i grushi). *Proceedings of the State Nikitski Botanical Garden*. 1964;37:256-259. [in Russian] (Здруйковская-Рихтер А.И. Культура зародышей в искусственных условиях как метод селекции раносозревающих сортов черешни, персика и груши. *Научные труды государственного Никитского ботанического сада*. 1964;37:256-259).