

Размножение сортов сливы амурской селекции в культуре *in vitro*

© Э.В. Некрасов*, Л.А. Шелихан

Амурский филиал Ботанического сада-института ДВО РАН, Благовещенск, Россия

*E-mail: ed_nekrasov@mail.ru

В работе представлены результаты клонального микроразмножения трех сортов сливы амурской селекции: 'Благовещенский чернослив', 'Людмила' и 'Оранжевая ранняя'. Растущие верхушки молодых побегов были предпочтительными эксплантами для получения культуры *in vitro* по сравнению с боковыми почками этих же побегов. Для введения в культуру *in vitro* и инициации роста меристем использовали агаризованную питательную среду Кворина-Лепуавра, с добавлением сорбита (20 г/л) и бензиламинопурина (3 мг/л). Размножение побегов выполняли на агаризованной среде Кворина-Лепуавра, модифицированной по составу микросолей и витаминов, с добавлением сахарозы (30 г/л), бензиламинопурина (0,2, 0,5 или 2,0 мг/л) и индолилмасляной кислоты (0,04 мг/л). Обнаружено, что для оптимального размножения необходимо чередовать выращивание растений на средах с концентрациями бензиламинопурина 2 мг/л (увеличение коэффициента размножения) и 0,2–0,5 мг/л (увеличение длины побегов). Более высокие показатели размножения микропобегов (коэффициент размножения и длина микропобега) показал сорт 'Благовещенский чернослив' (1,6 и 1,9, соответственно) по сравнению с сортами 'Людмила' (1,3 и 1,5) и 'Оранжевая ранняя' (1,4 и 1,2). Успешное укоренение микропобегов достигали после их предварительного выдерживания в водном растворе индолилмасляной кислоты (15 мг/л) с последующим переносом на агаризованную среду Кворина-Лепуавра без регуляторов роста. Растения-регенеранты сорта 'Благовещенский чернослив' также имели более высокие показатели корнеобразования: 5,8 корней на побег при средней суммарной длине побегов 11,6 см по сравнению с регенерантами сортов 'Людмила' (4,6 и 6,6, соответственно) и 'Оранжевая ранняя' (5,3 и 7,4). Метод позволяет получать корнесобственные растения трех сортов сливы.

Ключевые слова: *Prunus salicina*, слива, сорт, Амурская область, клональное микро-размножение, укоренение.

Слива является одной из самых распространенных плодовых культур на Дальнем Востоке благодаря высоким вкусовым качествам, исключительной морозостойкости и устойчивости к солнечным ожогам (Glinshchikova, 2008). Одной из причин высокой устойчивости местных сортов сливы к климатическим условиям дальневосточного региона является их происхождение, которое ведут от восточноазиатского вида – сливы китайской (*Prunus salicina* Lindl.). В Амурской области, благодаря работам селекционера Ф.И. Глинщиковой, выведено несколько сортов и сортообразцов сливы, из которых сорт 'Людмила' включен в Госреестр, а сорта 'Оранжевая ранняя', 'Амурский чернослив' и 'Красный овал' рекомендованы для возделывания в любительских садах Приамурья. Однако по мнению селекционера (Glinshchikova, 2008), лучшим из всех сортов амурской селекции может оказаться сорт 'Благовещенский черно-

слив', представляющий собой клоновую вариацию 'Маньчжурского чернослива'.

Для сохранения сортовых признаков сливы, как и других плодовых деревьев, используют различные способы вегетативного размножения, прежде всего прививку на соответствующий подвой. Корнесобственные растения сливы, которые получают без прививки, имеют ряд преимуществ, особенно для восстановления саженцев при вымерзании надземной части (Ivanova et al., 2018), что актуально для регионов с морозными зимами, к которым относится Амурская область. Получение корнесобственных растений сортов достигают черенкованием и укоренением черенков. Вариантом такого размножения является клональное микроразмножение, которое проводят в стерильных условиях с использованием микрочеренков на искусственной питательной среде. Преимущество клонального микроразмножения состоит в возможности освобождения посадочного

материала от патогенов. Этот метод в сочетании с различными дополнительными обработками особенно полезен для получения безвирусных растений (Kostyuk, Buntsevich, 2016; Magyar-Tabori et al., 2021). Размножение сливы, в том числе сортов сливы китайской (*P. salicina*), в культуре *in vitro* описано в ряде исследований (Zou, 2010; Buntsevich, Kostyuk, 2017; Ivanova et al., 2018; Kukharchik et al., 2018; Thakur et al., 2018; Thakur et al., 2021). Методы клонального микроразмножения до сих пор не применялись для размножения сортов сливы амурской селекции. Целью настоящего исследования было получение корнесобственных растений трех сортов сливы посредством введения в культуру *in vitro* и клонального микроразмножения.

Материалы и методы

Объектами исследования были три сорта сливы (*P. salicina*): 'Благовещенский чернослив', 'Людмила' и 'Оранжевая ранняя'. Растительный материал был предоставлен А.В. Зарицким (Дальневосточный государственный аграрный университет, г. Благовещенск). Зеленые растущие побеги были срезаны 29 мая 2017 г. с трехлетних деревьев, произрастающих в опытно-селекционном саду Дальневосточного государственного аграрного университета (с. Грибское, Благовещенский район, Амурская область). До начала работ побеги хранили в холодильнике.

Введение в культуру *in vitro* проводили на следующий день после сбора побегов, следуя процедуре, описанной ранее для абрикоса маньчжурского (Nekrasov, 2017). С побегов удаляли листья, разрезали на фрагменты (черенки, которые могли включать несколько узлов) и промывали в 0,5% растворе универсального синтетического моющего средства на магнитной мешалке около 30 мин с последующей отмывкой водопроводной водой не менее 5 раз. Фрагменты стерилизовали раствором 0,2% сулемы с добавлением Тритон Х-100 (1 капля на 50 мл раствора) в течение 1 мин с последующей промывкой стерильной водой 4 раза. В качестве эксплантов использовали растущие верхушки побегов и боковые почки со средних частей побегов. Экспланты помещали на питательную среду Кворина-Лепуавра (Quoirin, Lepoivre, 1977) (QL), модифицированную для введения в культуру *in vitro* и инициации роста меристем (QL меристем): макро- и микросоли QL (с увеличенным содержанием хелата железа в 1,5 раза), витамины QL, сорбит (20 г/л), агар (6 г/л) и 6-бензиламинопуридин (БАП, 3 мг/л), pH 5,7 (Nekrasov, 2017). Экспланты выдерживали при комнатной температуре в затемненном помещении в течение 3 суток, затем при

16-часовом фотопериоде (люминесцентные лампы холодного дневного света, 36 Вт, 2500 лм, Osram, Россия).

В первый пассаж через месяц экспланты переносили на питательную среду того же состава. Полученные конгломераты побегов, отдельные побеги или их фрагменты пересаживали раз в месяц на питательные среды: 1) QL меристем с добавлением 3 мг/л БАП или других цитокининов (зеатин, N⁶-(2-изопентенил)аденин); 2) питательную среду QL для размножения побегов (QL РП): макросоли QL, микросоли и витамины по (Driver, Kuniyuki, 1984), с добавлением агара (6 г/л), сахарозы (30 г/л), БАП (0,2, 0,5 или 2,0 мг/л) и 3-индолилмасляной кислоты (ИМК, 0,04 мг/л), pH 5,7 (Perez-Tornero, Burgos, 2007); 3) среда Ллойда и МакКоуна (Lloyd, McCown, 1980) (woody plant medium, WPM) с добавлением агара (6 г/л), сахарозы (30 г/л), БАП (0,5 мг/л) и ИМК (0,04 мг/л), pH 5,7.

Для укоренения микропобеги выдерживали в растворе ИМК в концентрациях 1,5, 7,5 и 15 мг/л в темноте при комнатной температуре в течение суток и затем переносили на среду QL РП без добавления регуляторов роста. Обработанные микропобеги выращивали при 16-часовом фотопериоде. Укорененные растения высаживали в субстрат, представляющий смесь торфа и вермикулита (2:1, по объему), и помещали в полиэтиленовые пакеты или закрытые контейнеры с относительной влажностью около 100%. Растения подкармливали раствором макросолей QL с добавлением микросолей MS (Murashige, Skoog, 1962) либо раствором коммерческого удобрения «Гумат+7» (Филиал ФГБУ «Россельхозцентр», г. Благовещенск), разведенного водой в 150 раз. Пакеты постепенно открывали, достигая комнатных условий. Для контроля развития плесени на торфяном субстрате использовали фунгицид «Хорус» (Сингента, Швейцария), следуя прилагаемой инструкции. По мере роста растения пересаживали в контейнеры большего объема. В качестве субстрата использовали смесь перегноя и песка (2:1, по объему). Для выращивания в условиях открытого грунта использовали смесь почвы и перегноя (1:1). Растения подкармливали, как указано выше.

Статистический анализ. Для расчета средних значений параметров (коэффициента размножения и длины микропобегов) каждого сорта и уровней значимости различий использовали соответствующие средние значения, полученные для всех микро-растений одного образца, растущих в одной колбе. В расчетах коэффициента размножения и длины микропобегов не использовали зачаточные и слишком короткие побеги из-за невозможности произ-

вести достоверные подсчеты и измерения. Уровни значимости различий между сортами и вариантами обработок оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Расчеты выполняли с использованием программы Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corp., США, 2003).

Результаты и обсуждение

Исходные экспланты после кратковременной стерилизации раствором сулемы были преимущественно свободны от микрофлоры (Табл. 1). Растущие верхушки молодых побегов оказались предпочтительными частями для инициации роста меристем *in vitro* и именно они дали начало устойчивым линиям в последующих пассажах. В целом, выход эксплантов, способных к дальнейшему росту и развитию, был средним для сортов 'Благовещенский чернослив' и 'Оранжевая ранняя', и низким для сорта 'Людмила' (Табл. 1).

Выращивание эксплантов на среде QL меристем с высоким содержанием БАП (3 мг/л) способствовало развитию конгломератов коротких побегов (Рис. 1). Замена в среде QL меристемы БАП на зеатин или N⁶-(2-изопентенил)аденин (2iP) также в концентрации 3 мг/л существенно не сказывалась на развитии конгломератов. Для роста побегов в длину конгломераты переносили на питательную среду QL РП с добавлением ИМК (0,04 мг/л) и БАП (0,2, 0,5 или 2 мг/л). При концентрации

Таблица 1. Введение в культуру *in vitro* сортов сливы *Prunus salicina*

Table 1. *In vitro* culture initiation of the *Prunus salicina* cultivars

Сорт и тип экспланта Cultivar and type of explants	Инфицированные экспланты, % Infected explants, %	Доля растущих эксплантов после 0 пассажа, % Portion of growing explants after initiation of tissue culture, %	Доля эксплантов, сохранившихся в культуре после 10 пассажей, % Portion of initial explants remained in tissue culture after 10 passages, %
'Благовещенский чернослив' 'Blagoveshchenskii chernosliv'			
Растущие верхушки побегов Tips of growing young shoots	0	60	30
Боковые почки Lateral buds	0	0	0
'Людмила' 'Lyudmila'			
Растущие верхушки побегов Tips of growing young shoots	10	20	20
Боковые почки Lateral buds	20	10	0
'Оранжевая ранняя' 'Oranzhevaya rannyaaya'			
Растущие верхушки побегов Tips of growing young shoots	0	67	33
Боковые почки Lateral buds	0	36	0

Рисунок 1. Развитие конгломератов микропобегов сливы сорта 'Благовещенский чернослив' на среде QL меристем (А–С) с добавлением 3 мг/л БАП (А), 3 мг/л зеатина (В), 3 мг/л 2iP (С) и на среде QL РП с добавлением 0,5 мг/л БАП (D) через 3 месяца после введения в культуру *in vitro*. Верхний и нижний ряд представляют культуры от двух разных эксплантов. Масштаб 0,5 см.

Figure 1. Development of microshoots of plume cv. 'Blagoveshchenskii chernosliv' on the culture medium QL of meristems (A–C) containing 3 mg/L BA (A), 3 mg/L zeatin (B), or 3 mg/L 2iP (C), and on the shoot proliferation culture medium QL containing 0.5 mg/L BA (D) after 3 months of the culture initiation. The upper and lower rows show lines originated from two different explants. Scale 0.5 cm. Abbreviations: BA – 6-benzylaminopurine, 2iP – N⁶-(2-isopentenyl) adenine.

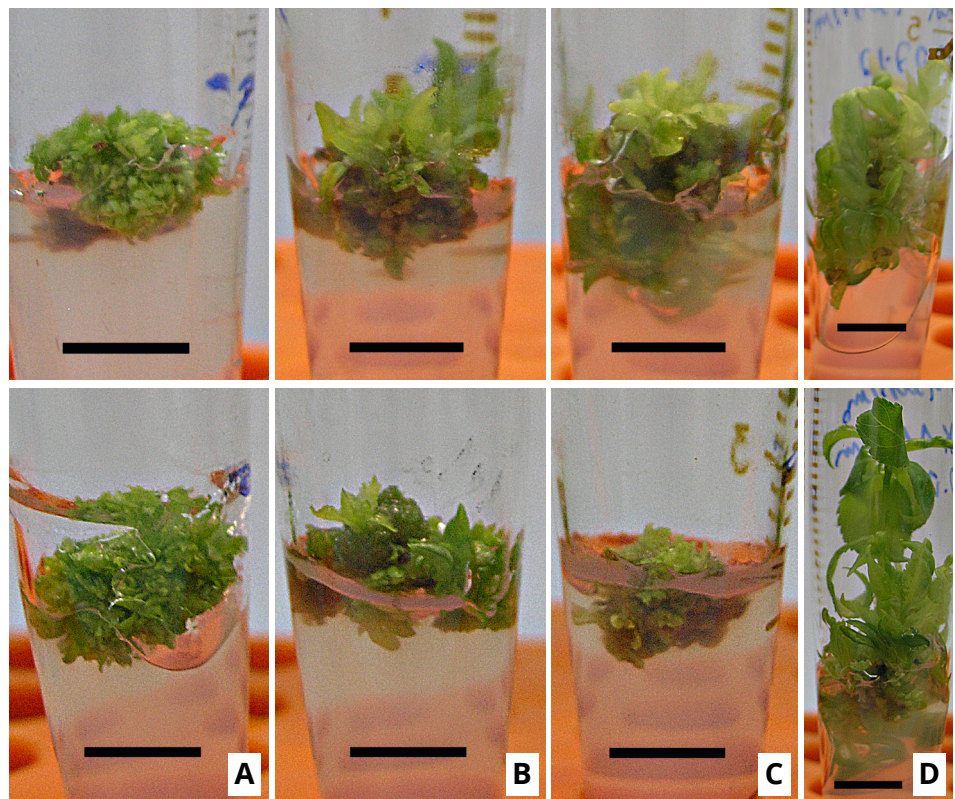


Таблица 2. Образование микропобегов в культуре *in vitro* сортов сливы *Prunus salicina***Table 2.** *In vitro* microshoot proliferation of the plume *Prunus salicina* cultivars

Сорт Cultivar	Регуляторы роста, мг/л Plant growth regulators, mg/L	Коэффициент размножения Proliferation rate	Длина микропобега, см Microshoot length, cm
'Благовещенский чернослив' 'Blagoveshchenskii chernosliv'	0,5 БАП; 0,04 ИМК 0.5 BA; 0.04 IBA	1,6±0,5	1,5±0,4
	0,2 БАП; 0,04 ИМК 0.2 BA; 0.04 IBA	1,0±0,0	1,9±0,7
'Людмила' 'Lyudmila'	0,5 БАП; 0,04 ИМК 0.5 BA; 0.04 IBA	1,3±0,3	1,2±0,5
	0,2 БАП; 0,04 ИМК 0.2 BA; 0.04 IBA	1,2±0,2	1,5±0,5
'Оранжевая ранняя' 'Oranzhevaya rannaya'	0,5 БАП; 0,04 ИМК 0.5 BA; 0.04 IBA	1,2±0,1	1,2±0,7
	0,2 БАП; 0,04 ИМК 0.2 BA; 0.04 IBA	1,4±0,4	1,2±0,5

Примечания: Использовали питательную среду QL для размножения побегов (QL РП). Показаны средние значения ± стандартные отклонения.
Notes: Shoot proliferation culture medium QL was used. Values are means ± standard deviations. Abbreviations: BA – 6-benzylaminopurine, IBA – indole-3-butyric acid.

БАП 2 мг/л наблюдали множественное образование побегов, однако их рост в длину был незначительным (результаты не показаны). Коэффициент размножения был невысоким или низким при концентрациях БАП 0,5 и 0,2 мг/л (Табл. 2), однако позволял получить более длинные побеги, пригодные для укоренения. Существенные различия коэффициентов размножения при разных концентрациях БАП (0,5 и 0,2 мг/л) были обнаружены только для микрорастений сорта 'Благовещенский чернослив' ($p=0,001$), для двух других сортов различия были незначительными. В целом, микрорастения сорта 'Благовещенский чернослив' имели наибольший отклик на повышение концентрации БАП до 0,5 мг/л, что выражалось в более высоком коэффициенте размножения, чем у сортов 'Людмила' и 'Оранжевая ранняя', но различия были существенными только между регенерантами сортов 'Благовещенский чернослив' и 'Оранжевая ранняя' ($p=0,01$). При концентрации БАП 0,2 мг/л коэффициент размножения у микрорастений сорта 'Благовещенский чернослив' был самым низким (Табл. 2). Перенос конгломератов на среду WPM вызывал подавление роста побегов и постепенную гибель культур.

На величину коэффициента размножения разных сортов сливы могут влиять не только содержание регуляторов роста и сортовая принадлежность, но и такие факторы как состав питательной среды, вирусное заражение эксплантов, органические кислоты (Buntsevich et al., 2015; Buntsevich, Kostyuk, 2017; Ivanova et al., 2018). В нашем эксперименте коэффициент размножения был гораздо ниже (Табл. 2), чем описано для сортов домашней сливы: 3,5 (Buntsevich et al., 2015),

2–5,8 (Buntsevich, Kostyuk, 2017), 1,2–4,5 (Ivanova et al., 2018). Для сортов *P. salicina* коэффициент размножения составлял 2–5 (Thakur et al., 2018) и 1–5 (Thakur et al., 2021) в зависимости от сорта и комбинации регуляторов роста. Хотя в нашей работе средний коэффициент размножения был низким, в некоторых случаях наблюдали образование до 10 побегов на конгломерат при концентрации БАП 0,5 мг/л. Для усиления мультипликации побегов возможно использование следующей схемы: получение конгломератов коротких побегов на среде с высоким содержанием БАП (2 мг/л), разделение конгломератов на фрагменты или отдельные побеги при следующем пассаже на среду с низким содержанием БАП (0,2 или 0,5 мг/л), что обеспечит получение более длинных побегов.

Микропобеги, пригодные для укоренения, были получены после 4-го пассажа для сорта 'Благовещенский чернослив', 5-го пассажа для сорта 'Оранжевая ранняя' и 6-го для сорта 'Людмила'. Образование корней наблюдали у побегов на среде, содержащей 0,2 мг/л БАП и 0,04 мг/л ИМК, и среде без добавления регуляторов роста. На среде QL РП (0,2 мг/л БАП, 0,04 мг/л ИМК) корнеобразование наблюдали довольно часто для микропобегов сорта 'Благовещенский чернослив' (26,5% от суммы побегов), для двух других сортов – в единичных случаях. Количество корней обычно не превышало единицу на побег. На среде QL РП без регуляторов роста доля побегов со спонтанным образованием корней составляла 7,3%, 20,0% и 47,1% для сортов 'Благовещенский чернослив', 'Людмила' и 'Оранжевая ранняя', соответственно. Количество корней варьировало от единицы до семи на побег.

Таблица 3. Образование корней микропобегами сливы в зависимости от концентрации ИМК**Table 3.** *In vitro* rooting of plume microshoots at different IBA concentrations

Концентрация ИМК (мг/л) и количество побегов (n) IBA content (mg/L) and shoot number (n)	Длина микропобега для укоренения, см Mean length of shoots for rooting, cm	Доля укорененных микропобегов, % Per cent rooting, %	Количество корней на побег, шт. Number of roots per shoot	Суммарная длина корней на одно микрорастение, см Total root length per one microplant, cm	Наличие каллуса, % Callus formation, %
'Благовещенский чернослив' 'Blagoveshchenskii chernosliv'					
1,5 (n=13)	1,6±0,3	15,4	0,2±0,4**/**	0,2±0,6**/**	15,4
7,5 (n=15)	1,8±0,4	60,0	1,4±1,5**	2,6±3,5*	20,0
15 (n=12)	1,7±0,3	83,3	5,5±4,5	7,8±6,7	25,0
'Людмила' 'Lyudmila'					
1,5 (n=6)	1,9±0,3	33,3	0,7±1,0**/*	1,0±1,6**/*	0,0
7,5 (n=5)	1,9±0,4	100,0	2,2±1,1	4,0±2,4	60,0
15 (n=6)	1,5±0,2	83,3	3,8±3,2	7,7±6,2	100,0

Примечания: Показаны средние значения ± стандартные отклонения. Звездочки (*, **, ***) обозначают уровень значимости различий (P=0,05, 0,01 и 0,001, соответственно): для концентрации ИМК 1,5 мг/л по сравнению с концентрациями 7,5 и 15 (после косой черты) мг/л, для концентрации 7,5 мг/л только по сравнению с 15 мг/л.

Notes: Values are means ± standard deviations. Asterisks (*, **, ***) indicate a significance level of differences (P=0.05, 0.01 and 0.001, respectively): for the concentration of IBA 1.5 mg/L as compared with the concentrations of 7.5 and 15 (after the slash) mg/L; for the concentration of 7.5 mg/L as compared with 15 mg/L.

Таблица 4. Укоренение микропобегов трех сортов сливы *P. salicina* в условиях *in vitro* после выдерживания в растворе ИМК (15 мг/л)**Table 4.** *In vitro* rooting of microshoots of different plume cultivars after preliminary incubation in the aqueous solution of IBA (15 mg/L)

Сорт и количество побегов (n) Cultivar and number of shoots (n)	Длина микропобегов, использованных для укоренения, см Mean length of shoots used for rooting, cm	Доля укорененных микропобегов, % Per cent rooting, %	Количество корней на микропобег, шт. Number of roots per microshoot	Суммарная длина корней на одно микрорастение, см Total root length per one microplant, cm	Наличие каллуса, % Callus formation, %	Доля микропобегов, тронувшихся в рост при укоренении, % Shoot growth during rooting, %
'Благовещенский чернослив' (n=37) 'Blagoveshchenskii chernosliv' (n=37)	2,0±0,5	97,3	5,8±3,4	11,6±6,6**/**	2,7	83,8
'Людмила' (n=19) 'Lyudmila' (n=19)	2,1±0,5	94,7	4,6±2,9	6,6±3,9	10,5	89,5
'Оранжевая ранняя' (n=25) 'Oranzhevaya rannaya' (n=25)	1,6±0,7	92,0	5,3±4,2	7,4±4,3	12,0	60,0

Примечания: Показаны средние значения ± стандартные отклонения. Звездочки (***) и (**) обозначают уровень значимости различий (P=0,001 и 0,01, соответственно): для сорта 'Благовещенский чернослив' по сравнению с сортами 'Людмила' и 'Оранжевая ранняя' (после косой черты).

Notes: Values are means ± standard deviations. Asterisks (***) and (**) indicate a significance level of differences (P=0.001 and 0.01, respectively) for the cultivar Blagoveshchenskii chernosliv as compared with the cultivars Lyudmila and Oranzhevaya rannaya (after the slash).

Ранее при работе с абрикосом маньчжурским было показано, что постоянное присутствие ИМК в питательной среде негативно влияет на развитие побега (Nekrasov, 2017). Поэтому в данном исследовании для достижения массового укоренения изолированные побеги выдерживали в растворе ИМК в темноте в течение суток и затем выращивали на

питательной среде QL РП без регуляторов роста. Тестирование различных концентраций ИМК (1,5, 7,5 и 15 мг/л) показало, что для микропобегов сорта 'Благовещенский чернослив' оптимальной является концентрация ИМК 15 мг/л, а для сорта 'Людмила' – 7,5 мг/л (Табл. 3). В другом эксперименте (Табл. 4) сравнение корнеобразования у по-

бегов разных сортов слив после их выдерживания в растворе ИМК 15 мг/л не выявило существенных различий между сортами по срокам появления корней (2-я неделя после обработки), доле укорененных побегов (92–97%) и по количеству корней на побег. Растения-регенеранты сорта 'Благовещенский чернослив' существенно отличались по суммарной длине корневой системы (на одно растение-регенерант) от сортов 'Людмила' и 'Оранжевая ранняя'. Доля побегов с каллусом была невысокой (до 12% от всех побегов), что отличалось от первого эксперимента (Табл. 3). Многие микропобеги начинали рост во время укоренения (Табл. 4), что демонстрировало явные преимущества этого подхода по сравнению с методом укоренения на питательной среде, содержащей ИМК, при котором наблюдали раннее увядание листьев и некроз апикальной части побегов (Nekrasov, 2017). В других работах, где также добавляли ауксины (ИМК, индолилуксусную кислоту) в питательную среду для укоренения побегов сливы, такие показатели, как количество корней и суммарная длина корней, были ниже: 1,9–2,4 корней/побег и 7,6–9,5 см при доле укорененных побегов 89–97% (Buntsevich, Kostyuk, 2017); менее 2 корней/побег и 5–6 см при доле укорененных побегов 20–57% (Kukharchik et al., 2018). Для *P. salicina* сорта 'Santa Rosa' была по-

казана низкая эффективность укоренения на питательной среде с ИМК (низкая доля укорененных побегов – 18,9%, образование каллуса) по сравнению с двухэтапной процедурой (выдерживание в растворе ИМК в течение 24 ч с последующим переносом на среду без регуляторов роста), при которой доля укорененных побегов существенно возрастала (до 80%) без формирования каллуса (Thakur et al., 2018). При этом количество корней (2,7) и их длина (3,6 см) были ниже, чем в нашей работе. В другой работе этих же авторов (Thakur et al., 2021) растения-регенеранты сорта 'Frontier' (*P. salicina*) имели показатели укоренения несколько ниже или сходные с нашими: укоренение 85%, 4,8 корней/побег, длина корней 3,5 см. Низкий уровень (10,4%) укоренения побегов *P. salicina* сорта 'Gulf-ruby' на питательной среде с ИМК удалось повысить за счет добавления в среду флороглюцина (Zou, 2010), хотя максимальный процент укоренившихся растений при этом не достигал 80%.

Укорененные *in vitro* побеги и полученные из них растения показаны на рисунке 2. Растения, высаженные в субстрат (торф–вермикулит), были чувствительны к условиям адаптации. В лабораторных условиях саженцы подвергались грибным заболеваниям. Обычным было развитие сапротрофных микромицетов на органическом субстра-



Рисунок 2. Растения-регенеранты *P. salicina* через месяц после начала укоренения *in vitro* (А–С) и эти же растения через 1,5 (D) и 3 (E, F) месяца после посадки в субстрат. Сорта: 'Оранжевая ранняя' (А, D), 'Благовещенский чернослив' (В, E), 'Людмила' (С, F). Шкала: 1 см для (А–С); 2 см для (D–F).

Figure 2. Regenerated plants of *P. salicina* after a month of rooting *in vitro* (A–C) and the same plants after 1.5 months (D) or 3 months (E, F) after planting into substrate. Cultivars: 'Oranzhevaya rannaya' (A, D), 'Blagoveshchenskii chernosliv' (B, E), 'Lyudmila' (C, F). Scale: 1 cm for (A–C); 2 cm for (D–F).

те (торф). Чрезмерное развитие плесени часто вело к гибели саженца, поэтому ее развитие необходимо контролировать фунгицидом, для чего использовали раствор коммерческого препарата «Хорус» (действующее вещество ципродинил). В осенний сезон 2018 г. большая часть адаптированных саженцев была заражена неидентифицированным патогеном. Симптомы заболевания заключались в появлении белого налета на листьях, которые постепенно желтели и опадали, а пятна приобретали коричневатую окраску (Рис. 3). В условиях лаборатории инфекция довольно легко передавалась на соседние незараженные растения. Обработка фунгицидами («Хорус», бордоская жидкость) не способствовала выздоровлению растений и впоследствии они погибли.

Наименьшая доля адаптированных растений была получена для сорта 'Благовещенский чернослив': из всех укорененных и высаженных в смесь торфа и вермикулита растений (128 шт.) только 35,1% были высажены непосредственно в открытый грунт или пересажены в смесь перегноя и песка. Для сортов 'Людмила' (54 шт.) и 'Оранжевая ранняя' (39 шт.) это доля составляла 66,7%. После первого этапа адаптации растений в смеси торфа и вермикулита в течение трех месяцев в открытый грунт (демонстрационный участок Дальневосточного государственного аграрного университета) было высажено: 'Благовещенский чернослив' – 21 шт., 'Людмила' – 21 шт., 'Оранжевая ранняя' – 24 шт. Недостаточно длительная предварительная адаптация растений, жаркая, засушливая погода и отсутствие должного укрытия привели к гибели основной части растений уже в первые недели после посадки. К концу второго вегетационного сезона в живых осталось 2 растения сорта 'Благовещенский чернослив' и 10 растений сорта 'Людмила'. На коллекционный участок Амурского филиала Ботанического сада-института ДВО РАН в открытый грунт высажены 10 саженцев сорта 'Благовещенский чернослив' и 7 саженцев сорта 'Людмила'. Корнесобственные растения сорта 'Оранжевая ранняя' не сохранились.

Этап адаптации растений слив амурской селекции, полученных в культуре *in vitro*, нуждается в дальнейшей оптимизации. Одним из путей улучшения развития и повышения выживаемости саженцев является поиск альтернативного субстрата для посадки растений-регенерантов. Так, доля растений двух сортов сливы, адаптированных к нестерильным условиям, составляла 43–46% при использовании смеси торфа и перлита. Замена такой смеси на ионообменный субстрат БИОНА 112 почти в два раза увеличивала выживаемость растений (Kukharchik et al., 2018).



Рисунок 3. Растения сливы, зараженные неидентифицированным патогеном в лабораторных условиях.

Figure 3. Plum plantlets infected with an unidentified pathogen under laboratory conditions.

Заключение

В результате исследования мы рекомендуем процедуру микроклонального размножения сортов сливы *P. salicina* амурской селекции по следующей схеме: 1) Использование растущих верхушек молодых побегов в качестве эксплантов. 2) Стерилизация эксплантов раствором 0,2% сулемы с добавлением Тритон Х-100 в течение 1 мин. 3) Инициация роста на агаризированной среде QL с добавлением сорбита (20 г/л) и БАП (3 мг/л). 4) Размножение микропобегов на агаризированной среде QL, модифицированной по составу микросолей и витаминов, с добавлением сахарозы (3%), БАП (0,2, 0,5 или 2,0 мг/л) и ИМК (0,04 мг/л). Для оптимального размножения предпочтительно чередовать выращивание микрорастений на средах с БАП 2 мг/л (увеличение коэффициента размножения) и 0,2–0,5 мг/л (увеличение длины микропобегов). 5) Для укоренения побегов предварительное их выдерживание в водном растворе ИМК (15 мг/л) с последующим

переносом на агаризованную среду QL, модифицированную по составу микросолей и витаминов, с добавлением сахарозы (3%), без регуляторов роста. б) При использовании субстрата на основе торфа для адаптации укорененных растений контролировать развитие микрофлоры периодической обработкой фунгицидом.

Благодарности

Авторы признательны к.б.н. А.В. Зарицкому (Дальневосточный государственный аграрный университет, г. Благовещенск) за предоставление растительного материала для выполнения работы. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № АААА-А20-120042090002-0).

Список литературы

- [Buntsevich et al.] Бунцевич Л.Л., Беседина Е.Н., Костюк М.А. 2015. Ростовые реакции эксплантов сливы *in vitro* при использовании препаратов группы янтарной кислоты. Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. № 36: 06. <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/06/14.pdf> (дата обращения: 25.10.2021).
- [Buntsevich, Kostyuk] Бунцевич Л.Л., Костюк М.А. 2017. Клональное микроразмножение сливы домашней *in vitro*. Научные труды СКЗНИИСиВ. Т. 12. С. 70–78.
- Driver J.A., Kuniyuki A.H. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience. 19: 507–509.
- [Glinshchikova] Глинщикова Ф.И. 2008. Селекция косточковых плодовых культур в Приамурье. Дальневосточный аграрный вестник. №2(6). С. 19–26. <https://cyberleninka.ru/article/n/selektsiya-kostochkovyh-plodovyh-kultur-v-priamurie> (дата обращения: 25.10.2021).
- [Ivanova et al.] Иванова О.С., Кобринец Т.П., Поух Е.В. 2018. Введение и микроразмножение сортов сливы *in vitro*. Плодоводство. Т. 30. С. 75–79.
- [Kostyuk, Buntsevich] Костюк М.А., Бунцевич Л.Л. 2016. Оздоровление плодовых и ягодных культур от вирусных инфекций меристемным методом *in vitro*. Плодоводство и виноградарство Юга России. № 40: 04. <http://journal.kubansad.ru/pdf/16/04/07.pdf> (дата обращения: 27.10.2021).
- [Kukharchik et al.] Кухарчик Н.В., Кастрицкая М.С., Змушко А.А., Бунцевич Л.Л. 2018. Укоренение и адаптация сортов сливы при выращивании корнесобственных саженцев *in vitro*. Плодоводство. Т. 30. С. 80–85.
- Lloyd G., McCown B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proceed. Inter. Plant Propag. Soc. 30: 421–427.
- Magyar-Tábori K., Mendler-Drienyovszki N., Hanász A., Zsombik L., Dobránszki J. 2021. Phytotoxicity and other adverse effects on the *in vitro* shoot cultures caused by virus elimination treatments: reasons and solutions. Plants. 10: 670. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10040670>
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473–497.
- [Nekrasov] Некрасов Э.В. 2017. Размножение *Armeniaca mandshurica* (Rosaceae) в культуре *in vitro*. Бюлл. БСИ ДВО РАН [Электронный ресурс]: науч. журн. Ботан. сад-институт ДВО РАН. Вып. 18. С. 81–88. DOI: <https://doi.org/10.17581/bbgi1814>
- Perez-Tornero O., Burgos L. 2007. Apricot micropropagation. In: S.M. Jain, H. Haggman (eds.) Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Dordrecht. 267–278 pp.
- Quoirin M., Lepoivre P. 1977. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. Acta Hort. 78: 437–442.
- Thakur M., Soni M., Sharma D.P., Vivek M., Sharma V. 2018. *In vitro* propagation of Plum (*Prunus salicina*) cv. ‘Santa Rosa’ and assessment of genetic stability using RAPD markers. Ind. J. Plant Physiol. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40502-018-0354-z>
- Thakur M., Sharma V., Luharch R. 2021. Propagation of plum (*Prunus salicina* L.) cultivar Frontier *in vitro* through control of shoot tip necrosis (STN) and validation of genetic integrity using ISSR markers. Plant Physiol. Rep. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40502-021-00580-6>
- Zou Y.-N. 2010. Micropropagation of Chinese plum (*Prunus salicina* Lindl.) using mature stem segments. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 38: 214–218.

***In vitro* propagation of plume cultivars selected in Amur Region, Russia**

© E.V. Nekrasov, L.A. Shelikhan

Amur Branch of Botanical Garden-Institute FEB RAS, Blagoveshchensk, Russia

Results are presented on clonal micropropagation for three cultivars selected in Amur Region: 'Blagoveshchenskii chernosliv', 'Lyudmila', and 'Oranzhevaya rannyaya'. Tips of growing young shoots are preferable explants for the tissue culture production as compared to lateral buds of the same shoots. The Quoirin-Lepoivre (QL) agar medium supplemented with sorbitol (20 g/L) and 6-benzylaminopurine (BA, 3 mg/L) was used for the establishment of explants and tissue culture initiation. Shoot proliferation was conducted on a QL agar medium with a modified microelement and vitamin composition and supplemented with sucrose (30 g/L), BA (0.2, 0.5, or 2.0 mg/L) and indole-3-butyric acid (IBA, 0.04 mg/L). Optimal shoot proliferation was noted to be achieved by alternate cultivation cycles on the medium with various BA concentration: 2 mg/L for an increased proliferation rate and 0.2–0.5 mg/L for an increased microshoot length. Higher values of shoot proliferation (the proliferation rate and microshoot length) were found for cv. 'Blagoveshchenskij chernosliv' (1.6 and 1.9 respectively) as compared to cv. 'Lyudmila' (1.3 and 1.5) and cv. 'Oranzhevaya rannyaya' (1.4 and 1.2). *In vitro* rooting was achieved after a preliminary incubation of microshoots in the aqueous solution of IBA (15 mg/L) with the subsequent cultivation on the growth regulator-free QL agar medium. The cultivar 'Blagoveshchenskij chernosliv' had higher values of rooting (5.8 roots per shoot and 11.6 cm of total root length) as compared to cv. 'Lyudmila' (4.6 and 6.6 respectively) and cv. 'Oranzhevaya rannyaya' (5.3 and 7.4). The protocol was used for production of own-rooted plants of the plum cultivars.

Keywords: *Prunus salicina*, plum, cultivar, Amur Region, clonal micropropagation, rooting.

References

- Buntsevich L.L., Besedina E.N., Kostyuk M.A. 2015. Ros-tovyye reaktsii eksplantov slivyy *in vitro* pri ispolzovaniy preparatov gruppy yantarnoi kisloty [Growth reactions of plum explants *in vitro* when using preparations of succinic acid group]. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii* [Fruit growing and viticulture of South Russia]. 36: 06. (In Russ.) Available at: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/06/14.pdf> (accessed 25.10.2021).
- Buntsevich L.L., Kostyuk M.A. 2017. Klonalnoye mikrorazmnozheniye slivyy domashnei *in vitro* [Clonal micropropagation of the European plum *in vitro*]. *Nauchnyye trudy SKZNIISiV*. 12: 70–78. (In Russ.)
- Driver J.A., Kuniyuki A.H. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*. 19: 507–509.
- Glinshchikova F.I. 2008. Seleksiya kostochkovykh plodovykh kultur v Priamurye [Selection of stone fruit crops in Priamurie]. *Dalnevostochnyi agrarnyi vestnik* [Far East Agrarian Bulletin]. 2(6): 19–26. (In Russ.) Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/seleksiya-kostochkovyh-plodovykh-kultur-v-priamurie> (accessed 25.10.2021).
- Ivanova O.S., Kobrinets T.P., Poukh E.V. 2018. Vvedeniye i mikrorazmnozheniye sortov slivyy *in vitro* [Initiation and micropropagation *in vitro* of plum varieties]. *Plodovodstvo* [Fruit-growing]. 30: 75–79. (In Russ.)
- Kostyuk M.A., Buntsevich L.L. 2016. Ozdorovleniye plodovykh i yagodnykh kultur ot virusnykh infektsii meristemnym metodom *in vitro* [Revitalization of fruit and berry crops from viral infections by the method of meristems *in vitro*]. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii* [Fruit growing and viticulture of South Russia]. 40: 04. (In Russ.) Available at: <http://journal.kubansad.ru/pdf/16/04/07.pdf> (accessed 27.10.2021).
- Kukharchik N.V., Kastritskaya M.S., Zmushko A.A., Buntsevich L.L. 2018. Ukoreneniye i adaptatsiya sortov slivyy pri vyrashchivaniy kornesobstvennykh sazhensev *in vitro* [Plum cultivar rooting and adaptation for growing of own-rooted plantlets *in vitro*]. *Plodovodstvo* [Fruit-growing]. 30: 80–85. (In Russ.)
- Lloyd G., McCown B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proceed. Inter. Plant Propag. Soc.* 30: 421–427.

- Magyar-Tábori K., Mendler-Drienyovszki N., Hanász A., Zsombik L., Dobránszki J. 2021. Phytotoxicity and other adverse effects on the *in vitro* shoot cultures caused by virus elimination treatments: reasons and solutions. *Plants*. 10: 670. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10040670>
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Nekrasov E.V. 2017. Razmnozheniye Armeniaca mandshurica (Rosaceae) v kulture *in vitro* [In vitro propagation of *Armeniaca mandshurica* (Rosaceae)]. *Byull. BSI DVO RAN* [Bulletin of the BGI FEB RAS]. 18: 81–88. (In Russ.) <https://doi.org/10.17581/bbgi1814>
- Perez-Tornero O., Burgos L. 2007. Apricot micropropagation. In: S.M. Jain, H. Haggman (eds.) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Dordrecht. 267–278 pp.
- Quoirin M., Lepoivre P. 1977. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Hort.* 78: 437–442.
- Thakur M., Soni M., Sharma D.P., Vivek M., Sharma V. 2018. *In vitro* propagation of Plum (*Prunus salicina*) cv. ‘Santa Rosa’ and assessment of genetic stability using RAPD markers. *Ind. J. Plant Physiol.* DOI: <https://doi.org/10.1007/s40502-018-0354-z>
- Thakur M., Sharma V., Luharch R. 2021. Propagation of plum (*Prunus salicina* L.) cultivar Frontier *in vitro* through control of shoot tip necrosis (STN) and validation of genetic integrity using ISSR markers. *Plant Physiol. Rep.* DOI: <https://doi.org/10.1007/s40502-021-00580-6>
- Zou Y.-N. 2010. Micropropagation of Chinese plum (*Prunus salicina* Lindl.) using mature stem segments. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 38: 214–218.