

УДК 634.45:57.085.2

ЭМБРИОКУЛЬТУРА И МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* ХУРМЫ ВИРГИНСКОЙ (*DIOSPYROS VIRGINIANA* L.)

Черкашина А.В., Митрофанова О.В., Казас А.Н.

Хурма виргинская (*Diospyros virginiana* L.) является ценной плодовой, декоративной и лекарственной культурой [1].

Среди известных видов хурмы, произрастающих на ЮБК (*Diospyros kaki* Thunb., *Diospyros lotus* L., *Diospyros virginiana* L.), именно хурма виргинская (*D. virginiana* L.) представляет особую ценность для межвидовой гибридизации. Она характеризуется большей зимостойкостью по сравнению с хурмой восточной (*D. kaki* Thunb). Однако плоды хурмы виргинской значительно мельче, чем у хурмы восточной [2].

Создание новых зимостойких и высокоурожайных сортов и гибридов хурмы проводится в Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре. Однако селекционная работа по получению таких сортов связана со значительными трудностями, так как семян образуется мало и они характеризуются низкой всхожестью.

Наиболее перспективным направлением повышения всхожести семян, получения жизнеспособных растений и генетического разнообразия является применение биотехнологических методов. Этими методами в НБС-ННЦ был получен новый зимостойкий сорт Россиянка [3, 4].

В настоящее время получение растений с использованием культуры органов и тканей *in vitro* имеет огромное значение в селекционно-генетических исследованиях, позволяет решать вопросы преодоления несовместимости при межвидовых и межродовых скрещиваниях [5].

Материалы и методы

Объектами исследования служили развитые и недоразвитые зиготические зародыши хурмы виргинской (*D. virginiana* L.) и проростки, полученные в процессе культивирования *in vitro* зародышей. Для получения изолированных зародышей в культуре *in vitro* плоды хурмы сорта Виргинская 213 погружали в 96%-ный этиловый спирт и обжигали в пламени спиртовки. Зародыши извлекали из семян в стерильных условиях и помещали шпателем на среду Монье [6].

Культуральные сосуды с зародышами содержали в условиях низких положительных температур ($4\pm 1^\circ\text{C}$) и отсутствия освещения в течение 14 суток. Затем их переносили в климатическую камеру с заданным режимом: температурой $24\pm 1^\circ\text{C}$, интенсивностью освещения 2 – 3 клк и 16- часовым фотопериодом.

В двухмесячном возрасте проростки извлекали, отсекали верхушки побегов и помещали на питательные среды МС [7] и В₅ [8]. В питательные среды вносили вещества цитокининового (БАП, зеатин, 2ip) и ауксинового (ИМК) типа действия.

Результаты и обсуждение

На среду Монье были помещены изолированные зародыши размером 5-7 мм, светлоокрашенные. После воздействия низких положительных температур зародыши изменяли окраску. На их поверхности и в питательной среде образовались зоны с черно-фиолетовой окраской (58%), светло-бурые (42%). Спустя 3 недели после введения зародышей в культуру *in vitro* они начинали увеличиваться в размерах. Из 62 эксплантов 6 почернели и погибли (9,6%).

Через 5-6 недель сформировались ярко-зеленые семядоли и главный корень, имеющий темно-коричневую окраску (рис. 1).

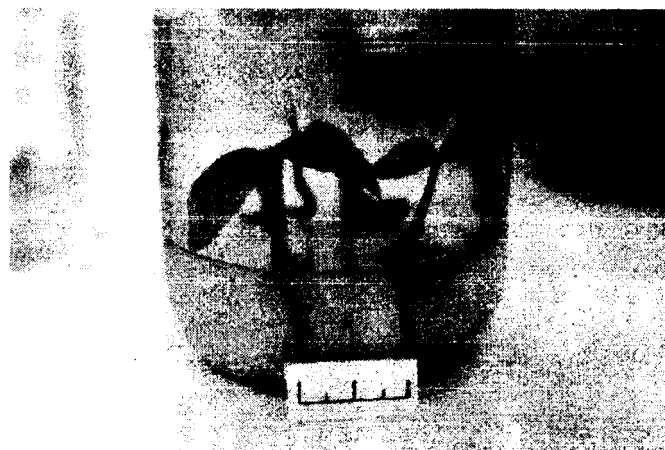


Рис. 1. Типичные проростки хурмы сорта Виргинская 213 на среде Монье

В процессе развития проростков (в возрасте 10 недель) наблюдали нормальное развитие побегов (18-20 мм), 3 – 4-х листьев, главного и боковых корней (41%). Однако у 11% проростков отсутствовала точка роста (рис. 2), листья не развивались. В этом случае отмечали образование на корнях корневых волосков. 11% растений имели антоциановое окрашивание побега.

При дальнейшем культивировании проростков со сформированной точкой роста (как типичных, так и с окрашенным и изогнутым побегом) из них были получены нормально развитые растения. Наряду с этим проростки без точки роста погибали.

Полученные проростки черенковали и помещали на питательные среды МС и В₅, дополненные различными цитокининами (табл. 1).

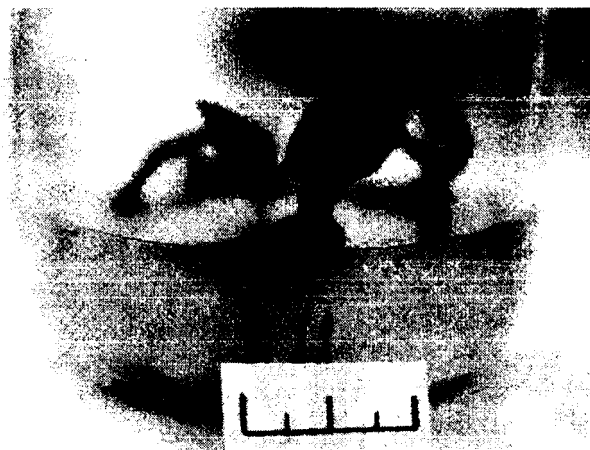


Рис. 2. Проростки хурмы сорта Виргинская 213 с погибшей точкой роста

Таблица 1
Развитие микропобегов хурмы виргинской *in vitro* на питательных средах МС и В₅ с различными цитокининами

Концентрация цитокининов, мг/л	Средняя длина микропобегов, мм	
	на среде МС	на среде В ₅
Контроль (0)	0	0
2 ip	0	0
5,0	7,2±1,2	10,3±0,9
БАП		
0,5	10,5±1,1	11,3±5,0
1,0	11,4±2,5	12,3±3,7
Зеатин		
1,0	16,0±1,5	15,6±3,8

Так, в процессе культивирования на питательной среде без цитокининов регенерацию микропобегов не наблюдали. Низкие концентрации 2ip не способствовали развитию экплантов. Присутствие в среде 2ip в концентрации 5 мг/л вызывало рост микрочеренков и микропобегов, а также образование листьев. Было отмечено, что добавление в питательные среды БАП в концентрации 1 мг/л индуцировало формирование розетки из 3 – 4-х зеленых почек в среднем на 1 растение.

Оптимальной оказалась питательная среда МС, содержащая зеатин в концентрации 1 мг/л, на которой микропобеги достигали максимальной длины ($16,0 \pm 7,5$ мм) (рис. 3).

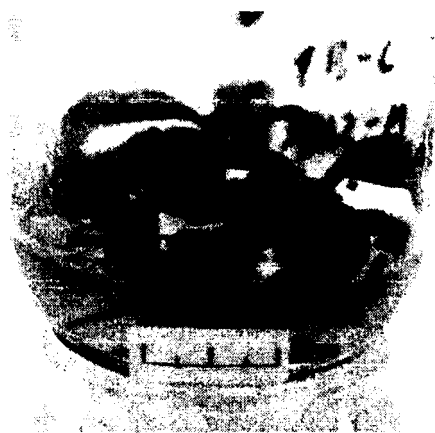


Рис. 3. Микропобеги хурмы сорта Виргинская 213 на среде МС с зеатином

Таким образом, в условиях *in vitro* из зиготических зародышей нами было выращено 53 проростка хурмы сорта Виргинская 213 и установлено, что для активной регенерации микропобегов необходимо присутствие в питательной среде зеатина в концентрации 1 мг/л.

Список литературы

1. Деревянко Н.В. Перспективы культуры хурмы виргинской (*Diospyros virginiana* L.) в условиях Нижнего Приднепровья // Бюл. Никит. ботан. сада. – 1998. – Вып. 80. – С. 80 – 84.
2. Казас А.Н., Белич А.А. Селекция хурмы // Интенсификация селекции плодовых культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 179 – 189.
3. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*. – М., 1974. – 60 с.
4. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура *in vitro* зародышей хурмы от межвидовой гибридизации // Бюл. Главного ботан. сада. – 1981. – Вып. 121. – С. 84 – 86.
5. Митрофанова И.В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 63 – 95.
6. Monnier M. Croissance et developpement des embryons globulaires de *Capsella Bursa-pastoris* cultivés *in vitro* dans un milieu a la base d'une nouvelle solution minerale // Bull. Soc. Bot. France. Memoires, Coll. Morphologie. – 1973. – P. 179 – 194.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – N 3. – P. 473 – 497.
8. Gamborg O.L., Eveligh D.E. Culture methods and delection of glucanases in cultures of w heat and barley // Can. Y. Biochem. – 1968. – V. 46. – N 5. – P. 417 – 421.

Поступила в редакцию 11.03.2003 г.