

УДК 634.42:57.085.2

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ЭКСПЛАНТОВ ФЕЙХОА НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Шишкина Е.Л.

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр НААН Украины, Ялта, Украина
E-mail: in_vitro@ukr.net*

Разработан способ получения асептической культуры фейхоа в условиях *in vitro*, позволяющий получить до 80% жизнеспособных эксплантов, свободных от контаминации. Изучены особенности развития первичных эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro*. Показано влияние зеатина и БАП в модифицированной питательной среде МС на регенерацию микропобегов фейхоа.

Ключевые слова: фейхоа, экспланты, морфогенез, регенерация, микропобег.

ВВЕДЕНИЕ

Вечнозеленое субтропическое растение фейхоа – сравнительно новая культура для Украины. Родина ее – Южная Америка. Род *Feijoa* Berg. относят к семейству (*Myrtaceae*) Juss. (Миртовые; надпорядок *Myrtales*) [1]. В Европе фейхоа появилась в 1890 г. В Никитском ботаническом саду первые декоративные насаждения фейхоа были заложены в 1910 г. завезенными из Сухумского ботанического сада саженцами. Сегодня коллекция фейхоа в НБС–ННЦ насчитывает около четырехсот форм, возраст которых составляет более 30-70 лет. Плоды фейхоа употребляются в свежем и переработанном виде. Они богаты пектинами, углеводами, витамином С, Р - активными веществами, полифенольными соединениями с преобладанием катехинов.

Исследования последних лет показали, что успешное размножение отдельных сортов и форм фейхоа возможно с применением культуры органов и тканей [2-5]. В настоящее время особый интерес представляет изучение и выявление общих закономерностей возможности реализации органогенеза и соматического эмбриогенеза у перспективных сортов и форм фейхоа из коллекции НБС–ННЦ и разработка биотехнологических приемов их размножения и сохранения.

Цель наших исследований – выявить морфогенетический потенциал эксплантов фейхоа на начальных этапах культивирования в условиях *in vitro*, получить асептическую культуру и изучить особенности развития первичных эксплантов растений сорта Никитская Ароматная и перспективных крупноплодных форм Ф1 и Ф2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений НБС–ННЦ НААН Украины. Исходный растительный

материал – растения фейхоа сорта Никитская Ароматная и перспективных селекционных форм Ф1 и Ф2 коллекционных насаждений НБС–ННЦ. Стерилизацию растительного материала и его введение в изолированную культуру проводили в ламинарных боксах марки Fatran (Чехия). При стерилизации инструментов, лабораторной посуды и питательных сред придерживались общепринятых методов асептики [6, 7]. В качестве первичных эксплантов использовали меристематические ткани и вегетативные почки однолетних побегов. Для освобождения эксплантов от экзогенной инфекции применяли 70%-ный этиловый спирт (C₂H₅OH), Domestos (2-4%-ный раствор гипохлорита натрия NaClO), Украина, Дез ТАБ (0,45% активного хлора в растворе), Украина, 1% раствор Thimerosal (Германия).

Экспланты культивировали на модифицированной нами питательной среде Мурасиге и Скуга (1962) [8]. Для индукции морфогенеза в качестве регуляторов роста использовали зеатин, кинетин и 6-бензиламинопурин (БАП). Стерилизацию питательных сред осуществляли в автоклаве при давлении 0,7-0,8 атм. в течение 20-25 мин.

Культуральные сосуды с изолированными эксплантами помещали в климатическую комнату с температурой 22-25°C, 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2-3 клк. Инфицированные и погибшие экспланты удаляли, а жизнеспособные переносили на среду для дальнейшего культивирования. Субкультивирование эксплантов проводили через 3-4 недели. Учитывали количество регенерировавших микропобегов с одного экспланта. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Математическая статистика», версия 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в ряде научных публикаций представлены сведения о приемах стерилизации различных культур [9-12]. Однако, как показали наши исследования, часто при проведении стерилизации происходит сильное повреждение растительных тканей, поэтому необходимо было применять наименее токсичные реагенты, подбирая их концентрацию и экспозицию стерилизации. Развитие вегетативных почек фейхоа в условиях *in vitro* зависело от сезона года, на протяжении которого изолировали первичные экспланты. В результате проведенных нами экспериментов установлено, что наилучшим сроком отбора эксплантов фейхоа является июнь-сентябрь, с появлением зеленых вызревших побегов. В этот период они лучше переносят стерилизацию и активнее начинают развиваться. На этапе введения в культуру *in vitro* применение известных способов стерилизации оказалось не эффективным, так как при этом наблюдалась низкая жизнеспособность эксплантов и высокий уровень контаминации. Для получения асептической культуры фейхоа было изучено действие различных реагентов, их концентраций и экспозиций (табл.1). Как видно из таблицы 1, оптимальной оказалась ступенчатая стерилизация, которая выполнялась в следующей последовательности: растительный материал погружали в 70%-ный раствор этилового спирта, затем 0,3% раствор Дез ТАБ и 1% раствор Thimerosal. После

каждого реагента экспланты промывали в стерильной дистиллированной воде, что позволило получить до 80% свободных от контаминации. При этом экспланты не меняли окраску и проявляли высокую способность к морфогенезу. При использовании 2-4% раствора гипохлорита натрия эффективность стерилизации была низкой: уровень контаминации составлял 65-75%. Регенерационный потенциал стерильных эксплантов был низким и не превышал 3-8%. Как видно из данных, приведенных в таблице 1, только 3-8% стерильных эксплантов были способны к дальнейшей регенерации микропобегов. Сокращение экспозиции стерилизации увеличивало частоту контаминации эксплантов.

Таблица 1
Результаты стерилизации различными способами эксплантов
***Feijoa sellowiana* Berg.**

Способ стерилизации	Режим стерилизации, мин	Количество эксплантов, %	
		инфицированных	развившихся
1. 70 %-ный C ₂ H ₅ OH 0,3%-ный р-р Дез ТАБ 1% р-р Thimerosal	1 6-15 10	20,0 ± 5,6	50,0 ± 11,7
2. 70%-ный C ₂ H ₅ OH 2%-ный р-р Domestos	1 6-18	75,0 ± 7,36	8,0 ± 4,5
3. 70%-ный C ₂ H ₅ OH 4%-ный р-р Domestos	1 6	65,0 ± 16,5	3,0 ± 1,9

Жизнеспособные экспланты фейхоа помещали на питательную среду МС в нашей модификации, дополненную регуляторами роста. Применение питательной среды МС обусловлено тем, что в ее составе содержится повышенная концентрация неорганического азота за счет присутствия аммонийного и нитратного азота. Это обеспечивает стабильность протекания процессов дифференциации и способствует получению регенерантов. Для снижения отрицательного воздействия на растительные ткани фенолов, которые, как правило, у древесных растений выделяются на месте среза растительных тканей, обычно используют антиоксиданты: аскорбиновую кислоту, глутатион [2, 10, 13]. Нашими опытами показано положительное влияние аскорбиновой кислоты на первом этапе культивирования, что снижало ингибирующее действие фенолов и способствовало повышению жизнеспособности эксплантов. Эксперименты показали, что испытанные нами регуляторы роста оказывали различное влияние на рост основного побега и активацию пазушных почек, которые наблюдали в течение первого пассажа (до 55%). При этом одновременно с развитием главного побега было отмечено формирование 1-2 адвентных почек. Такие побеги разделяли на микрочеренки с вегетативной почкой и культивировали на среде МС, дополненной 1,85-2,73 мкМ зеатина или 2,22-3,55 мкМ БАП (табл. 2). Дальнейшее увеличение концентрации цитокининов приводило к формированию каллуса, оводнению микропобегов и их гибели. Уменьшение

концентрации зеатина до 0,91-1,36 мкМ и БАП до 2,22 мкМ в питательной среде заметно снижало частоту побегообразования, но способствовало вытягиванию. Сравнительный анализ результатов испытания регуляторов роста на индукцию побегообразования показал необходимость введения последнего в состав питательной среды МС. Исключение цитокинина из состава питательной среды полностью подавляло как образование пазушных побегов, так и апикальный рост. Культивирование микропобегов в течение двух пассажей на среде МС без зеатина приводило к некрозу верхушек побегов, потемнению стебля, отмиранию листьев и завершалось полной гибелью побега. Как видно из данных, представленных в таблице 2 при концентрации БАП 0,88-1,33 мкМ ни в одном из вариантов опытов формирование микропобегов не отмечено. Кинетин в используемых нами концентрациях (0,93 - 9,30 мкМ) замедлял регенерацию микропобегов исследуемых генотипов фейхоа, при этом активизировал образование и рост каллуса в базальной части вегетативной почки. Полученные данные согласуются с ранее полученными результатами по размножению отдельных сортов и форм фейхоа с применением культуры органов и тканей [2, 3]. Полученные в процессе эксперимента микропобеги достигали 4,5-5 см и при этом не имели морфологических отклонений.

Таблица 2

Влияние концентрации БАП и зеатина на регенерацию микропобегов из изолированных вегетативных почек *Feijoa sellowiana* Berg. после 4-х недельного культивирования в условиях *in vitro*

Концентрация цитокинина, мкМ	Среднее количество микропобегов / на изолированную почку, шт.
Контроль*	0,2 ± 0,1
Зеатин	
0,91	1,7 ± 0,1
1,36	2,5 ± 0,1
2,73	2,9 ± 1,3
4,56	3,1 ± 0,8
9,12	3,7 ± 1,2
БАП	
0,88	0
1,33	0
2,22	1,3 ± 0,1
4,40	1,8 ± 0,1

Примечание. *Контроль – питательная среда без цитокинина

ВЫВОД

Таким образом, в процессе исследований разработаны приемы получения асептической культуры эксплантов фейхоа сорта Никитская Ароматная и селекционных форм Ф1 и Ф2. Установлены особенности морфогенеза вегетативных почек в условиях *in vitro* и подобраны оптимальные концентрации регуляторов роста

в питательной среде МС для этапов индукции развития морфогенеза эксплантов и регенерации микропобегов.

Список литературы

1. Субтропические плодовые и орехоплодные культуры: Научно-справочное издание. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2012. – С. 157-168.
2. Кондратенко О.Н. Влияние различных концентраций витаминов на рост и развитие растений фейхоа в культуре *in vitro* / О.Н. Кондратенко, И.В. Митрофанова // Ученые записки Таврического нац. ун-та им. В.И. Вернадского. Серия Биология. – 2003. – Т. 16 (55), № 2. – С. 98-102.
3. *In vitro* morphogenesis in Feijoa sellowiana. Somatic embryogenesis and plant regeneration / M.P. Guerra, R. Pescador, L. Dal Vesco [et al.] // Acta Hort (ISHS). – 1997. – Vol. 452 – P. 27-36.
4. Protocolo de micropropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) / A.C. Oltramari, L.L.D. Vesco, E.L. Pedrotti [et al.] // Ciência Rural. – 2000. – V. 30, № 1. – P. 61-68
5. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg) / S. Stefanello, L.L. Dal Vesco, J.P. Ducroquet [et al.] // Scientia Horticulturae. – 2005. – Vol. 105, №1. – P. 117-126.
6. Калинин Ф.Л. Технология микроклонального размножения растений./ Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
7. Митрофанова О.В. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур / О.В. Митрофанова, И.В. Митрофанова, А.В. Смьков, Н.П. Лесникова // Интенсификация селекции плодовых культур: Труды Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118 – С. 189-200.
8. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473-497.
9. Иванова Н.Н. Клональное микроразмножение некоторых листовых декоративных растений / Н.Н. Иванова // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур: Труды Никит. ботан. сада. – 1977. – Т. 119. – С. 153-168.
10. Черевченко Т.М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. / Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. – Киев: Наукова думка, 2008. – 559 с.
11. Basal S.K. Ornamental Plant sand Biotechnology. / Basal S.K. – Iapur : Book Enclave, 2007. – V. VIII. – 308 p.
12. Dixon R.A. Plant cell culture: a practical approach. / Dixon R.A. – Oxford, Washington: IPL Press Limited, 1985. – 236 p.
13. Митрофанова И.В. Регенерация *in vitro* микропобегов из вегетативных почек зизифуса китайского (*Zizyphus jujuba* Mill.) и физические факторы культивирования / И.В. Митрофанова // Бюл. Никит. бот. Сада. – 2003. – Вып. 87. – С. 63-66.

Иванова Н.М. Особливості розвитку експлантів фейхоа на етапі введення в умови *in vitro* / Н.М. Иванова, І.В. Митрофанова, О.Л. Шишкіна // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 4. – С. 67-71.

Розроблено спосіб отримання асептичної культури фейхоа в умовах *in vitro*, який дозволяє отримати до 80% життєздатних експлантів, вільних від контамінації. Показано вплив зеатину та БАП в модифікованому поживному середовищі МС на регенерацію мікропагонів в умовах *in vitro*.

Ключові слова: фейхоа, експланті, морфогенез, регенерація, мікропагін.

Ivanova N.N. Peculiarities of development of feijoa explants in condition *in vitro* on the stape of introduction / N.N. Ivanova, I.V. Mitrofanova, E.L. Shishkina // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 4. – P. 67-71.

The method of obtaining of aseptical culture of feijoa in condition *in vitro* allowed to receive 80% of viable explants free from contamination has been worked out. The peculiarities of development of primary explants on the stage of introduction in culture *in vitro* have been studied. The influence of zeatine and BA in modified medium MS on the regeneration of feijoa microshoots has been shown.

Keywords: explants, morphogenesis, regeneration, microshoot.

Поступила в редакцію 17.11.2012 г.