

**УДК 634.42:57.085.2**

## **ОРГАНОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ ФЕЙХОА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

***Иванова Н.Н., Митрофанова И.В.***

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, Ялта, Россия  
E-mail: in\_vitro@ukr.net*

Исследованы особенности органогенеза в культуре высечек листа и сегментов побега растений фейхоа сорта Никитская Ароматная, а также перспективных крупноплодных форм Ф1 и Ф2 в условиях *in vitro*. Изучено влияние регуляторов роста НУК, ИУК, БАП и ТДЗ на индукцию побегообразования. Установлены эффективные концентрации ИУК и БАП, а также ТДЗ в питательной среде МС, индуцирующие регенерацию микропобегов из сегментов побега в условиях *in vitro*. Показано, что при использовании в качестве исходных эксплантов высечек листа на всех испытанных средах отмечено формирование неморфогенного каллуса.

**Ключевые слова:** фейхоа, экспланты, органогенез, регенерация, микропобег.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Субтропические плодовые культуры являются источником наиболее важных компонентов питания человека. Климатические условия Крыма позволяют выращивать различные ценные субтропические культуры, среди которых особое место занимает вечнозеленое субтропическое растение фейхоа (*Feijoa sellowiana* Berg). Плоды фейхоа употребляются в свежем и переработанном виде. Традиционные методы вегетативного размножения имеют ряд ограничений, особенно когда необходимо получить за короткий период большое количество посадочного материала. Биотехнологические подходы, основанные на культивировании органов и тканей многолетних субтропических плодовых растений в условиях *in vitro* позволяют освободить растения от вирусной инфекции, а также решить проблему массового тиражирования ценных видов и сортов для пополнения генофонда и создания медленно растущих коллекций в условиях *in vitro*. Однако до настоящего времени не разработаны способы прямой и непрямой регенерации растений *in vitro* большинства сортов фейхоа отечественной селекции.

В настоящее время в НБС-ННЦ продолжаются исследования по изучению основных факторов, влияющих на процессы морфогенеза перспективных сортов и селекционных форм растений фейхоа в условиях *in vitro* [1-4]. Установлена зависимость регенерационной способности эксплантов от сроков введения первичных эксплантов, условий их стерилизации, состава питательной среды и условий культивирования.

Цель наших исследований – выявить особенности прямого и непрямого органогенеза различных эксплантов сорта Никитская Ароматная и перспективных

крупноплодных форм Ф1 и Ф2 и получить стабильную регенерацию микропобегов в условиях *in vitro*.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений НБС–ННЦ НААН Украины. Для исследований были выбраны растения фейхоа сорта Никитская Ароматная и перспективных крупноплодных селекционных форм Ф1 и Ф2 из коллекционных насаждений НБС–ННЦ. Для освобождения эксплантов от экзогенной инфекции применяли ступенчатую стерилизацию, которая выполнялась в следующей последовательности: растительный материал погружали в 70%-ный раствор этилового спирта (1 мин), затем в 0,45% раствор Дез ТАБ (10 мин) и 1% раствор Thimerosal (10 мин). После каждого реагента растительный материал промывали в стерильной дистиллированной воде. Экспланты помещали на модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [5], дополненную зеатином. Для изучения органогенеза сегменты побега и высадки листьев культивировали на среде МС, дополненной регуляторами роста растений:  $\alpha$ -нафтилуксусной кислотой (НУК), индоллил-3-уксусной кислотой (ИУК), тидиазуроном (ТДЗ) и 6-бензиламинопурином (БАП) в различных комбинациях концентраций: 1) 8,06 мкМ НУК + 6,62 мкМ БАП, 10,74 мкМ НУК + 8,90 мкМ БАП, 16,11 мкМ НУК + 13,30 мкМ БАП; 2) 8,56 мкМ ИУК + 6,62 мкМ БАП, 11,42 мкМ ИУК + 8,90 мкМ БАП, 17,13 мкМ ИУК + 13,30 мкМ БАП; 3) 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 и 15,0 мкМ ТДЗ. Контролем служила среда МС без регуляторов роста. Стерилизацию питательных сред осуществляли в автоклаве при давлении 0,7-0,8 атм. в течение 20-25 мин.

Колбы с изолированными эксплантами помещали в культуральную комнату с температурой 24-25° С, 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2-3 клк. Субкультивирование эксплантов проводили через 3-4 недели. В процессе культивирования учитывали количество регенерировавших микропобегов с одного экспланта, проводили визуальный анализ сформировавшегося каллуса. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью прикладной программы «Математическая статистика», версия 6.0.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культура органов и тканей является искусственной растительной системой. Помещая изолированную клетку в условия *in vitro*, реализацию ее тотипотентности можно направить по пути соматического эмбриогенеза и органогенеза [6]. Большинство растений фейхоа из коллекции НБС-ННЦ являются возрастностарыми. В связи с этим большой научный и практический интерес представляет изучение морфогенетических потенций органов и тканей взрослого растения в условиях *in vitro*. Взрослые растения размножаются намного сложнее, при этом могут быть источником ценных хозяйственных признаков. Известно, что работа с таким материалом затрудняется тем, что постепенно в тканях и органах растений происходят процессы, приводящие к ингибированию роста и регенерационной способности: часто полученные микропобеги характеризуются медленным ростом,

низкой способностью к укоренению и адаптации [7]. Вегетативные почки исследуемых растений фейхоа (30-40-летнего возраста) были введены в культуру *in vitro* в период с июня по сентябрь, с появлением на них новых побегов. Это позволило снизить уровень контаминации до 20%. После регенерации пазушных микропобегов (1-2 шт./эксплант) на модифицированной среде МС, дополненной 0,91-1,85 мкМ зеатина их черенковали на отдельные сегменты. В качестве исходных эксплантов для дальнейших исследований использовали листья с черешком с нанесением поранения по краю, а также сегменты побега размером 0,3 см с узлом.

Культивирование листьев и побегов в культуре *in vitro* на различных вариантах среды МС позволило выявить их различную способность к регенерации микропобегов. Известно, что развитие адвентивных побегов во многом зависит от типа экспланта. У многих растений экспланты листа обладают высоким морфогенетическим потенциалом и в присутствии в среде регуляторов роста способны к регенерации как соматических зародышей, так и адвентивных микропобегов [8].

На питательной среде МС без регуляторов роста индукцию органогенеза не наблюдали. Экспланты были зелеными в течение 15-18 суток, а затем темнели и погибали. Наши исследования показали, что введение в питательную среду НУК и БАП не индуцировало регенерацию микропобегов в культуре эксплантов листа и побега фейхоа. При культивировании эксплантов с регуляторами роста НУК и БАП, а также ИУК и БАП через 7-10 суток наблюдали формирование каллуса на черешке и по краю листа. Известно, что в сочетании ауксин и цитокинин индуцируют органогенез в культуре листа. Однако нами во всех вариантах опыта отмечено формирование неморфогенного каллуса ткани рыхлой консистенции серо-коричневой окраски. Регенерация микропобегов из такого каллуса не наблюдалась.

Культивирование сегментов побега с узлом на питательных средах с НУК и БАП показало, что во всех испытанных вариантах сред в основании побегов формировался неморфогенный рыхлый каллус. Вместе с тем на питательной среде с 11,42 мкМ ИУК + 8,90 мкМ БАП было получено по 1-2 микропобега/эксплант, которые визуально морфологически не отличались от нормальных побегов. Дальнейшее культивирование эксплантов фейхоа на среде аналогичного состава не способствовало увеличению коэффициента размножения. В связи с этим наши исследования были направлены на поиск других регуляторов роста, способных индуцировать процессы регенерации эксплантов фейхоа. Для индукции регенерационного потенциала растительной клетки в состав питательной среды МС был введен ТДЗ.

Известно, что разработка способа прямой регенерации адвентивных побегов из листьев и сегментов побегов древесных и кустарниковых растений с применением ТДЗ позволяет не только размножать растения, но и изучать процессы морфогенеза, которые индуцируются в клетках экспланта. Это соединение фенилмочевины является эффективным биорегулятором, который проявляет цитокининовую активность в различных системах, включая и органогенез из различных эксплантов для целого ряда растений [2, с. 199-201].

При использовании питательных сред, содержащих различные концентрации ТДЗ, у эксплантов фейхоа наблюдали прямую регенерацию микропобегов и каллусогенез. Так, при добавлении в питательную среду МС 3, 6, 9 и 12 мкМ ТДЗ через 3 недели культивирования эксплантов побега наблюдали образование вегетативных почек и микропобегов в зоне узла у 90% эксплантов фейхоа сорта Никитская Ароматная, 86% у эксплантов Ф2 и 80% – Ф1 (табл. 1).

**Таблица 1**  
**Регенерационный потенциал эксплантов побегов и листьев растений фейхоа на питательных средах с различными концентрациями ТДЗ**

Сорт	Тип первичного экспланта	Кол-во экспл. реген. побеги, %	Кол-во регенерировавших микропобегов/эксплант, шт.						
			концентрация ТДЗ, мкМ						
			0	1	3	6	9	12	15
1 Н.А.	лист	0	0	0	к	к	к	к	к
	побег	90±2,3	0	0	1,1±0,1	2,2±0,6	2,9±0,8	2,0±0,1	к
2 Ф1	лист	0	0	0	к	к	к	к	к
	побег	80±2,8	0	0	1,0±0,2	1,8±0,9	1,9±0,7	1,6±0,3	к
3 Ф2	лист	0	0	0	к	к	к	к	к
	побег	86±3,1	0	0	1,2±0,1	1,9±0,8	2,3±0,5	1,8±0,3	к

к – каллусогенез

Количество микропобегов, развивающихся из одного экспланта через 4 недели культивирования, составило 2-3 шт. (рис. 2). Отмечено образование нормальных микропобегов с 3-5 хорошо развитыми зелеными листьями. Формирования оводненных микропобегов не зафиксировано.



Рис. 2. Прямой органогенез в культуре эксплантов побега фейхоа формы Ф2 на среде МС, дополненной 12 мкМ ТДЗ

При культивировании на модифицированных питательных средах с различными сочетаниями ТДЗ (3-12 мкМ) более 4-х недель дальнейшее увеличение частоты адвентивного побегообразования не наблюдалось. Однако при этом происходило развитие эксплантов, что проявлялось в увеличении длины и толщины побега, а также размеров и числа листьев. У всех изучаемых растений фейхоа адвентивные микропобеги регенерировали без промежуточной каллусной стадии развития, что обеспечивало их генетическую стабильность. Повышение концентрации ТДЗ до 15 мкМ вызывало формирование рыхлого неморфогенного каллуса у эксплантов побега всех изучаемых растений.

На эксплантах листа каллус образовывался по его периметру в местах поранения, вдоль центральной жилки и на черешке; он был плотным и имел бело-зеленую окраску (рис. 3). При дальнейшем культивировании каллус некротизировался.



Рис. 3. Формирование каллуса в культуре эксплантов побега и листа фейхоа формы Ф2 на среде МС, дополненной 15 мкМ ТДЗ

В процессе исследований установлено, что частота регенерации микропобегов зависела и от генотипа растения фейхоа. Так, у сорта Никитская Ароматная количество микропобегов на среде МС с 9 мкМ ТДЗ составило  $2,9 \pm 0,8$  шт./эксплант, у формы Ф2 –  $2,3 \pm 0,5$  шт./эксплант, у формы Ф1 –  $1,9 \pm 0,7$  шт./эксплант.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, в результате проведенных исследований изучены особенности морфогенеза растений в культуре изолированных эксплантов фейхоа сорта Никитская Ароматная и форм Ф1 и Ф2. Установлено, что в культуре сегментов побега регенерация микропобегов осуществлялась на среде МС, дополненной ТДЗ. Адвентивные микропобеги регенерировали прямым путем непосредственно из клеток экспланта, что обеспечило их генетическую стабильность. Максимальное

количество микропобегов –  $2,9 \pm 0,8$  шт./эксплант было получено у сорта Никитская Ароматная на среде МС, содержащей 9 мкМ ТДЗ.

#### Список литературы

1. Кондратенко О.Н. Влияние различных концентраций витаминов на рост и развитие растений фейхоа (*Feijoa sellowiana* Berg.) в культуре *in vitro* / О.Н. Кондратенко, И.В. Митрофанова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия Биология. – 2003. – Т. 16 (55), №2. – С. 98-102.
2. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур / И.В. Митрофанова – К.: «Аграрная наука», 2011. – 344 с.
3. Иванова Н.Н. Особенности развития эксплантов фейхоа на этапе введения в условия *in vitro* / Н.Н. Иванова, И.В. Митрофанова, Е.Л. Шишкина // Ученые записки Таврического нац. ун-та им. В.И. Вернадского. Серия Биология. – 2012. – Т. 25 (64), 4. – С. 67-71.
4. Mitrofanova I.V. Development of recipient system of wood subtropical plants *in vitro* / I.V. Mitrofanova, O.V. Mitrofanova // Acta Universitatis Latveiensis. Biology. – 2004. – V. 676. – P. 189-196.
5. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, № 3. – P. 473-497.
6. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
7. Mohan J.S. Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops / J.S. Mohan, De Klerk G-J. // Plant Tissue Culture and Biotechnology. – 1998. – V. 4, № 2. – P. 63-75.
8. Черевченко Т.М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т.М. Черевченко, А.Н. Лаврентьева, Р.В. Иванников. – К.: Наукова думка, 2008. – 559 с.

### ORGANOGENESIS IN THE CULTURE OF DIFFERENT FEIJOA EXPLANTS IN VITRO

*Ivanova N.N., Mitrofanova I.V.*

*Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center, Yalta, Crimea, Russia  
E-mail: in\_vitro@ukr.net*

Peculiarities of *in vitro* organogenesis in the culture from leaf and stem segments of *Feijoa sellowiana* cultivar Nikitskaja Aromatnaja (Nikitskaja Fragrant) and perspective large-fruit forms F1 and F2 have been studied. It has been found out that regenerative ability correlates with the terms of the original explants interpolation, their sterilization conditions, composition of the culture medium and culture conditions. Leaves with petioles and segments of microshoots, grown in MS medium with 0.91-1.85 мкМ zeatin, were used as explants. Influence of such growth regulators as NAA, IAA, BAP and TDZ on the induction of shoots` formation *in vitro* has been researched. It has been determined that on the medium with BAP and NAA also BAP and IAA explants formed nonmorphogenic callus. Besides in MS medium added with 11.42 мкМ IAA and 8.9 мкМ BAP 1-2 shoots per explants were formed and they looked like normal shoots. Further culture of *Feijoa* explants in the same medium hasn't led to increasing of propagation coefficient. Under addition 3, 6, 9 and 12 мкМ of TDZ to the medium

regeneration of microshoots from the shoot segments have been noticed. The number of regenerated microshoots after 4 weeks of the culture was 4 shoots per explant. Feijoa explants` culture for more than four weeks in the modified mediums with TDZ didn`t give the increasing of shoots formation frequency. Only growth of shoots and leaves has been noticed. Shoots` regeneration took place without intermediate stage of callus formation that has provided their gene stability. Increasing of concentration up to 15 mkM led to formation of crumby nonmorphogenic callus in shoot segments in all studied plants. Our investigations have shown particular correlation between frequency of microshoots regeneration and genotype of Feijoa plant. It has been determined that for cultivar Nikitskaja Aromatnaja (Nikitskaja Fragrant) number of microshoots, in MS medium added with 9 mkM TDZ, was  $2.9\pm 0.8$  per explants, for form F2 they were  $2.3\pm 0.5$  per explants and for form F1 –  $1.9\pm 0.7$  per explants. It has been shown that using of the leaf parts as initial explants on all mediums added with different TDS concentrations led to the formation of light-green dense callus which necrotized during the further culture. Microshoots` regeneration hasn`t been noticed in any variant of the experiment. At the base of the results peculiarities of plants morphogenesis in the culture of isolated leaf parts and shoot segments in studied genotypes of Feijoa have been determined and possible ways for microshoots regeneration have been shown.

**Keywords:** Feijoa sellowiana, explants, organogenesis, regeneration, microshoot.

#### References

1. Kondratenko O.N., Mitrofanova I.V., Influence of various concentration of vitamins on growt and development of feijoa plants (*Feijoa sellowiana* Berg.) *in vitro*, Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University, Series Biology, chemistry, **16** (55), 2, 98-102 (2003).
2. Mitrofanova I.V., Somatic embryogenesis and organogenesis as a basis of obtaining and preservation of perennial horticultural plants, (Agrarnaj nauka, 2011).
3. Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., and Shskina E.L., Peculiarities of development of feijoa explants in conditioi *in vitro* on the stape of introduction, Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University, Series Biology, chemistry, **25** (64),4, 67-71 (2012).
4. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Development of recipient system of wood subtropical plants *in vitro*, Acta Universitatis Latveiensis. Biology, **676**, 189-196 (2004).
5. MurashigeT., A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture, *Physiol. Plant.*, **15**, 3, 473-497 ( 1962.)
6. Kunakh V.A.,Biotechnology of medicinal plants. Cenetic, physiological and biochemical basis, (Logos, 2005).
7. Mohan J.S., De Klerk G-J., Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops, *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, **4**, 2, 63-75 (1998).
8. Cherevchenko T.M., Lavrenteva A.N., Ivannikov R.V., Biotechnology of tropical and subtropical plants *in vitro*, (Naukova dumka, 2008).

Поступила в редакцию 12.11.2014 г.