

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОРОСТКОВ МАСЛИНЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ

Г.И.МЕЛИХОВА;

И.В.МИТРОФАНОВА, доктор биологических наук

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Маслина (*Olea europaea* L.) – одно из древнейших культурных растений, которое уже более двух тысяч лет служит человечеству источником питательных плодов и легкоусвояемого оливкового масла [3]. Кроме того, вечнозеленое оливковое дерево декоративно, неприхотливо, хорошо переносит обрезку, благодаря чему широко используется в озеленении городов ЮБК [4].

Размножение этой ценной культуры традиционными методами затрудняется тем, что черенки многих сортов маслины плохо укореняются, а семена в обычных условиях прорастают в течение 2–3 лет [3, 5]. Исследования биотехнологов средиземноморских стран показали, что достойной альтернативой семенному размножению и черенкованию может стать размножение с использованием методов культуры органов и тканей. При наличии отработанной схемы применение культуры *in vitro* позволяет значительно сократить сроки и снизить себестоимость получения высококачественного посадочного материала ценных генотипов *O. europaea*, а также ускорить селекционный процесс [1, 9].

В 80-х годах двадцатого столетия на территории СНГ в НБС–ННЦ С.В.Шевченко, В.А.Шолохова и Л.Ф.Мязина занимались исследованием данного вопроса. Использование метода эмбриокультуры позволило им получить из гибридных семян маслины растения, многие из которых в настоящее время вступили в стадию плодоношения [6]. Однако особенности морфогенеза *in vitro* крымских сортов *O. europaea* до сих пор исследованы недостаточно.

Цель нашей работы состояла в том, чтобы выявить морфогенетический потенциал органов и тканей перспективных сортов маслины в условиях *in vitro*. В задачи настоящего исследования входило получить асептическую культуру зародышей маслины, индуцировать развитие проростков, а также изучить особенности их формирования на агаризованной питательной среде.

Объекты и методы

Объектами исследования служили перспективные сорта маслины из коллекционных насаждений НБС – ННЦ: три сорта селекции НБС (Никитская, Обильная, Крымская Превосходная) и два кавказских сорта (Толгомская и Ломашенская). В качестве первичных эксплантов использовали зародыши, полученные от свободного опыления.

Зрелые плоды, отобранные в ноябре, протирали марлевой салфеткой, смоченной в 70%-м этаноле, обрабатывали 96%-м этанолом, обжигали в пламени спиртовки, после чего удаляли околоплодник и извлекали зародыш. Экспланты помещали на агаризованную среду Монье [8] без регуляторов роста.

После этого зародыши подвергали стратификации путем помещения в холодовую камеру (отсутствие освещения, температура 0–5°C). Спустя 2,5–3 месяца проростки, длина корешков которых составляла не менее 4–5 см, пересаживали на свежую питательную среду, заглубляя корешок. Пробирки с сеянцами переносили в культуральную комнату с температурой 24±1°C, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2000–3000 лк (белый свет).

Контролем служили семена, высаженные в нестерильную почву в условиях *in vivo*. Скарификацию семян проводили, незначительно повреждая твердую оболочку скальпелем. Наряду с этим с помощью инструментов наносили и более глубокие повреждения. В качестве субстрата использовали смесь листовой земли, торфа и песка в соотношении 10:1:1,5. Проращивание осуществляли в условиях теплицы при температуре 20–25°C. Обработку результатов экспериментов производили при помощи методов статистического анализа. Повторность опыта была пяти-, десятикратной.

Результаты и обсуждение

Известно, что успех клонального микроразмножения субтропических плодовых культур, в том числе и маслины, зависит от возраста и состояния растения-донора. Публикации зарубежных исследователей свидетельствуют о том, что экспланты, отобранные с ювенильных растений, отличаются высокой жизнеспособностью и хорошо адаптируются к условиям *in vitro* [7, 10]. Для получения ювенильного материала *O.europea* нами был заложен эксперимент по проращиванию семян в почвенном субстрате и на агаризованной питательной среде.

По классификации М.Г.Николаевой семена маслины европейской обладают экзогенным и эндогенным органическим покоем, что обуславливает их длительное прораствание при обычном посеве [2, 3]. Для ускоренного получения сеянцев семена этой культуры обрабатывают растворами сильных кислот и щелочей, царапают, надкалывают или полностью удаляют твердую оболочку механическим путем. В наших опытах при проращивании *in vivo* скарификация заключалась в нанесении поверхностных царапин или надпиливания на глубину 2–3 мм.

Частота всхожести семян, высаженных в нестерильный почвенный субстрат, в зависимости от материнской формы составила от 0 до 40%. Прораствание семян наблюдали через 100–120 суток при глубокой скарификации и только через 285–300 суток – при поверхностной. Полное раскрытие семядолей у образовавшихся проростков происходило соответственно в течение 120–135 и 297–330 суток с момента посева в субстрат (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние генотипа и условий культивирования
на развитие проростков маслины**

Исходная форма (сорт)	Условия проращивания		Количество развившихся семян, %	Сроки полного раскрытия семядолей, сут
Никитская	<i>in vivo</i>	I	20	297±7,0
		II	25	135±3,5
	<i>in vitro</i>		100	60±2,3
Крымская Превосходная	<i>in vivo</i>	I	0	–
		II	0	–
	<i>in vitro</i>		100	92±4,5
Обильная	<i>in vivo</i>	I	40	330±6,3
		II	28	121±6,6
	<i>in vitro</i>		80	75±3,5
Толгомская	<i>in vivo</i>	I	0	–
		II	0	–
	<i>in vitro</i>		50	88±2,8
Ломашенская	<i>in vivo</i>	I	25	303±2,5
		II	17	120±5,3
	<i>in vitro</i>		100	86±1,6

Примечание. Скарификация: I – легкая, II – глубокая; (–) прораствания не наблюдали в течение 1,5 лет.

Результаты наших опытов по эмбриокультуре подтверждают имеющуюся в литературе информацию о том, что зародыши маслины при проращивании *in vitro* не нуждаются в периоде покоя [6]. Так, спустя 30 суток стратификации происходило увеличение размеров зародышей, полученных от сортов Никитская, Толгомская и Ломашенская, спустя 42 – сортов Обильная и Крымская Превосходная.

Известно, что в культуре зародышей маслины нередко происходит интенсивное формирование каллуса, а также первичный и вторичный соматический эмбриогенез [6, 7, 10]. Однако в нашем эксперименте развитие зародышей шло только по пути прямого формирования проростков. Спустя 40–47 суток культивирования на агаризованной питательной среде у 50–100% зародышей появлялся зародышевый корешок. После этого полное раскрытие семядолей наблюдали в течение 4–6 суток, а появление первой пары настоящих листьев – через 7–10 суток после выставления пробирок с проростками на свет.

У проростка О–2, полученного от свободного опыления сорта Обильная, сформировались два зародышевых корешка вместо одного. Еще одна интересная особенность – наличие трех одинаковых семядолей вместо двух – отмечена у проростка Н–3, материнской формой которого был сорт Никитская. Остальные зародыши развивались без отклонений от нормы.

Растения, полученные путем культуры зародышей, исходными формами которых служили сорта Обильная и Никитская, характеризовались быстрым развитием и спустя 120 суток от начала эксперимента имели по 3–4 пары настоящих листьев, основной корень и массу корешков второго порядка (табл. 2). В дальнейшем нами планируется получить культуру пазушных побегов и провести адаптацию проростков к условиям *in vitro*.

Таблица 2

**Морфологические характеристики проростков маслины спустя 120 суток
культивирования в условиях *in vitro***

Генотип	Высота надземной части, см	Количество пар настоящих листьев, шт.	Размеры листьев, см		Количество корешков 2-го порядка, шт.
			длина	ширина	
1	2	3	4	5	6
Н–1	7,6	4	1,30±0,03	0,31±0,03	23
Н–2	6,3	3	1,13±0,05	0,38±0,03	10
Н–3	3,8	3	1,10±0,04	0,42±0,02	12
1	2	3	4	5	6
О–1	5,0	3	1,10±0,05	0,43±0,02	22
О–2	6,7	3	1,00±0,03	0,47±0,04	15
Л–1	1,0	0	–	–	4
Л–2	1,1	0	–	–	3
Т–1	2,0	1	1,25±0,06	0,25±0,03	3
КП–1	2,3	0	–	–	0

Примечание. Материнские формы (сорта): Н – Никитская, О – Обильная, КП – Крымская Превосходная, Л – Ломашенская, Т – Толгомская.

Выводы

1. Сочетание методов скарификации, стратификации и эмбриокультуры позволяет значительно повысить частоту всхожести, ускорить прорастание семян и стимулировать развитие проростков маслины европейской по сравнению с посевом в почвенный субстрат в условиях *in vivo*.

2. Установлено, что основным путем развития зародышей маслины в культуре *in vitro* является прямой органогенез с формированием полноценных проростков. Показана высокая частота прорастания у сортов Никитская и Обильная.

3. Использование культуры зародышей маслины позволяет провести ювенилизацию растений и получить сеянцы, характерной особенностью которых является быстрый рост. Полученные проростки могут представлять интерес для селекционной работы.

Список литературы

1. Митрофанова И.В. Клональное микроразмножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Тр. ГНБС. – Ялта, 1997. – Т. 119. – С. 63–95.
2. Николаева М.Г. Физиология глубокого покоя семян. – Л.: Наука, 1967. – 207 с.
3. Николаева М.Г. Некоторые итоги изучения покоя семян // Ботан. журн. – 1977. – Т. 62, № 9. – С. 1350–1368.
4. Орехоплодные и субтропические плодовые культуры: Справ. изд. / Ядров А.А., Синько Л.Т., Казас А.Н. и др. – Симферополь: Таврия, 1990. – 160 с.
5. Слизык-Маслова Л.Н. Растения крымских парков. Четыре времени года. – Севастополь: Библекс, 2008. – 256 с.
6. Шевченко С.В., Шолохова В.А, Мязина Л.Ф. Эмбриокультура маслины европейской (*Olea europaea* L., сем. Oleaceae) // Бюл. ГНБС. – Ялта, 2009. – Вып. 99. – С. 97–100.
7. *In vitro* germination of three Tunisian olive varieties / Maalej M., Drira N., Chaari-Rkhis A., Trigui A. // Acta Horticulturae. – 2002. – №586. – P. 903–906.
8. Monnier M. Croissance et developpement des embryons globulaires de *Capsella bursa-pastoris* cultives *in vitro* dans du milieu a base d'une nouvelle solution minerale // Bull. Soc. Bot. France Memories, Coll. Morphologie. – 1973. – P. 179–194.
9. New perspective for biotechnologies in olive breeding: morphogenesis, *in vitro* selection and gene transformation / Rugini E., Gutierrez-Pesce P., Spampinato P.L., Ciarmiello A., D'Ambrosio C. // Acta Horticulturae. – 1999. – №474. – P. 107–110.
10. Rugini E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Olive (*Olea europaea* L.) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1988. – V. 14., №3. – P. 207–214.

Рекомендовано к печати д.б.н., проф. Шевченко С.В.