

УДК 634:45:57.085.2

РАЗЛИЧНЫЕ ПУТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ *DIOSPYROS KAKI* THUNB. СОРТА ЗОЛОТИСТАЯ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Наталья Николаевна Иванова, Ирина Вячеславовна Митрофанова,
Сергей Юрьевич Хохлов

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита
invitro-plant@mail.ru

Изучено влияние регуляторов роста 6-бензиламинопурина (БАП) и индолил-3-масляной кислоты (ИМК) на регенерацию микропобегов из вегетативных почек хурмы восточной сорт Золотистая. Увеличение концентрации БАП значительно влияло на регенерацию микропобегов и сильнее проявлялось при добавлении ИМК в питательную среду МС с половинной концентрацией макроэлементов KNO_3 и NH_4NO_3 . Максимальная частота регенерации побегов (75%) была получена на среде $\frac{1}{2}$ МС, дополненной 8,80 мкМ БАП и 0,98 мкМ ИМК через 8 недель после начала эксперимента. Данные, полученные в результате проведенных исследований показывают, что активная регенерация микропобегов хурмы в условиях *in vitro* возможна при добавлении в питательную среду БАП и ИМК. Представлены результаты первых этапов по регенерации микропобегов с использованием в качестве исходных эксплантов высечек листа. Показано, что наличие в питательной среде МС 6,0 и 9,0 мкМ тиазурина (ТДЗ) способствовало формированию морфогенного каллуса и дальнейшему органогенезу. Получено до 6-8 микропобегов хурмы сорта Золотистая на высечку листа.

Ключевые слова: хурма; экспланты; регуляторы роста; микропобег; органогенез

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 субтропическое растение хурма восточная *Diospyros kaki* Thunb. Плоды хурмы богаты витаминами и полифенольными веществами, каротиноидами, лейкоантоцианами, а также органическими соединениями калия, кальция, железа и йода. Мякоть зрелых плодов содержит 13 органических кислот, включая лимонную и яблочную, красящие и дубильные вещества, макро- и микроэлементы, девять из которых необходимы организму человека. Плоды содержат до 25,9% сахаров, представленных глюкозой и фруктозой. При этом содержание сахарозы незначительное – от 0,3 до 4,7%, что позволяет использовать их как диетический продукт. Кроме того они характеризуются низкой кислотностью, что позволяет использовать плоды при лечении многих заболеваний. Сок хурмы обладает бактерицидными свойствами в отношении кишечных инфекций и золотистого стафилококка. В листьях содержатся почти все микроэлементы и витамины, поэтому они могут служить лечебным средством при анемии [2].

Начиная с конца 80-х годов проводились исследования по микроразмножению хурмы [3, 5, 7, 16]. А.И. Здруйковской-Рихтер в Никитском ботаническом саду через эмбриокультуру были получены растения сорта Россиянка [1]. Эффективная воспроизводимая методика регенерации растений является важным шагом для использования потенциала хурмы. Тем не менее, универсальный протокол для регенерации хурмы, применимый для всех сортов, до сих пор не разработан.

В начале 2000-х годов в отделе биотехнологии растений Никитского ботанического сада был разработан способ прямой регенерации из листовых эксплантов хурмы сорта Меадер [12]. Вместе с тем установлена зависимость

регенерационной способности эксплантов отдельных сортов от сроков введения первичных эксплантов, условий их стерилизации, состава питательной среды и условий культивирования [11].

Цель наших исследований – выявить особенности регенерации растений через органогенез из вегетативных почек и высечек листа у хурмы сорта Золотистая в условиях *in vitro*.

Объекты и методы исследования

Объект исследования – хурма сорт Золотистая селекции Никитского ботанического сада. Гибрид от скрещивания сортов Триумф и Украинка. Относится к группе константных сортов. Крона полушаровидная, высота 2,5 м. Листья зеленые, яйцевидные, средней величины. Плоды округлые, массой 146-291 г. Сорт десертный. Может использоваться в качестве опылителя [2].

Исследования проводились на базе лаборатории биотехнологии и вирусологии растений Никитского ботанического сада. Для введения в культуру *in vitro* использовали спящие вегетативные почки, изолированные в феврале, а также высечки листьев микропобегов, полученных в условиях *in vitro*. Для освобождения эксплантов от экзогенной инфекции применяли ступенчатую стерилизацию, которая выполнялась в следующей последовательности: сегменты побега с вегетативной почкой погружали в 70%-ный раствор этилового спирта (1 мин), затем в 1%-ный раствор Thimerosal (Sigma, США) на 10 мин и 0,3%-ный раствор Дез ТАБ (действующие вещества: трихлоризоциануровая кислота ($C_3O_3N_3Cl_3$) ТХЦК-45%, натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты Na-соль ДХЦК-20%, Медпроминвест, Украина) на 12-15 мин с последующей 3-х кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. В качестве первичных эксплантов использовали сегменты побега с почкой, вегетативные почки с микрощитком, вегетативные почки с удаленными почечными чешуями.

Стерильные экспланты помещали на модифицированную МС среду [13] с половинной концентрацией макроэлементов KNO_3 и NH_4NO_3 , содержащую сахарозу (Россия), агар бактериологический (Panreac, Испания) и дополненную БАП и ИМК (Sigma, США). Экспланты культивировали в пробирках закрытых стерильной фольгой, каждая содержала 30 мл среды и почку, помещенную базальной частью на питательную среду. Для регулирования регенерационных процессов в культуре *in vitro* в питательную среду $\frac{1}{2}$ МС вводили 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 2,20-17,80 мкМ и 0,98 мкМ индолил-3-масляной кислоты (ИМК). Контролем служила среда без БАП. Для размножения полученных микропобегов их переносили на среду $\frac{1}{2}$ МС с 4,40 мкМ БАП.

Листья в асептических условиях отделяли от микропобегов, культивируемых *in vitro*, разрезали на квадраты с центральной жилкой и черешком листа и помещали на питательную среду МС адаксиально и абаксиально к среде. В колбе находился один лист, рассеченный на 3-4 высечки. Эксперимент состоял из 2 вариантов. Одну часть культивировали на свету, а другую – в отсутствии освещения при 25°C в термостате MIR 254 (SANYO, Япония). В экспериментах использовали цитокинин тидиазурон (ТДЗ, Sigma, США) в концентрациях 6,0; 9,0 и 12,0 мкМ. Контрольной была среда МС с 3,0 мкМ ТДЗ.

Все исследования проводили в асептических условиях в боксе биологической безопасности второго класса SC2 (фирма ESCO, Сингапур). Колбы и пробирки с эксплантами содержали в культуральной комнате с 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения $25-37,5 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ при температуре 25-26°C, а также в термостате при 25°C. Субкультивирование эксплантов осуществляли через 3-4 недели. Каждую серию опытов выполняли трижды в десятикратной повторности.

Учитывали регенерационную способность культивируемых эксплантов (частота индукции образования микропобегов и число вновь полученных микропобегов на эксплант). Всю обработку данных осуществляли с помощью программы STATISTICA for Windows, 6.0 StatSoft, Inc. 1984-2001.

Результаты и обсуждение

Размножаемый материал генетически стабилен, если микропобеги в условиях *in vitro* формируются из апикальных и латеральных почек. Известно, что почечные чешуи некоторых видов растений содержат значительное количество абсцизовой кислоты [18], являющейся стимулятором покоя. Удаление почечных чешуй и добавление регуляторов роста в питательную среду на этапе введения в культуру оказало эффективное влияние на прерывание покоя почек и начало роста микропобегов хурмы сорта Золотистая. Вместе с тем удаление чешуй у вегетативных почек также уменьшило впоследствии количество инфицированных эксплантов.

Для индукции побегообразования нами были использованы регуляторы роста БАП и ИМК. Чаще всего для регенерации микропобегов хурмы *in vitro* применяют зеатин [6, 10, 14], зеатин в комбинации с ИУК [15], зеатин и БАП [3, 9, 11, 12], БАП и НУК [7]. Фукуи и др. [8] установили, что для сорта Nishimurawase БАП был менее эффективен чем зеатин, но только в отношении показателя длины побегов. Зеатин был необходим в качестве индуктора удлинения побегов в концентрациях от 10^{-5} мол/л до 10^{-4} мол/л. Тетсумура [17] рекомендовал заменять зеатин на БАП в среде для множественного побегообразования, поскольку зеатин является самым дорогим цитокинином. В этом случае микропобеги могут успешно развиваться на среде с БАП. Ряд авторов [8] также указывал, что регенерация микропобегов значительно зависит не только от используемого цитокинина, но и от генотипа исходного растения.

В ходе эксперимента нами было установлено, что оптимальными исходными эксплантами являлись вегетативные почки с удаленными почечными чешуями: до 84% эксплантов, помещенных на среду $\frac{1}{2}$ МС, содержащую 8,90-13,20 мкМ БАП и 0,98 мкМ ИМК образовывали по одному микропобегу (рис 1).

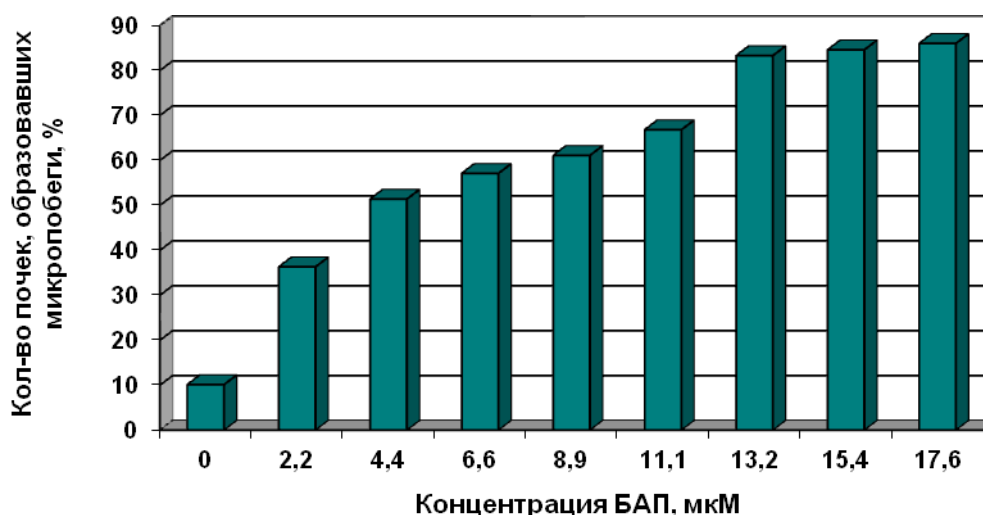


Рис. 1 Регенерационный потенциал первичных эксплантов хурмы сорта Золотистая на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС, дополненной 0,98 мкМ ИМК

Высокая концентрация цитокинина вместе с удалением почечных чешуй способствовала раскрытию почек через 3-4 недели культивирования (рис. 2). Более низкие концентрации БАП были не эффективны.

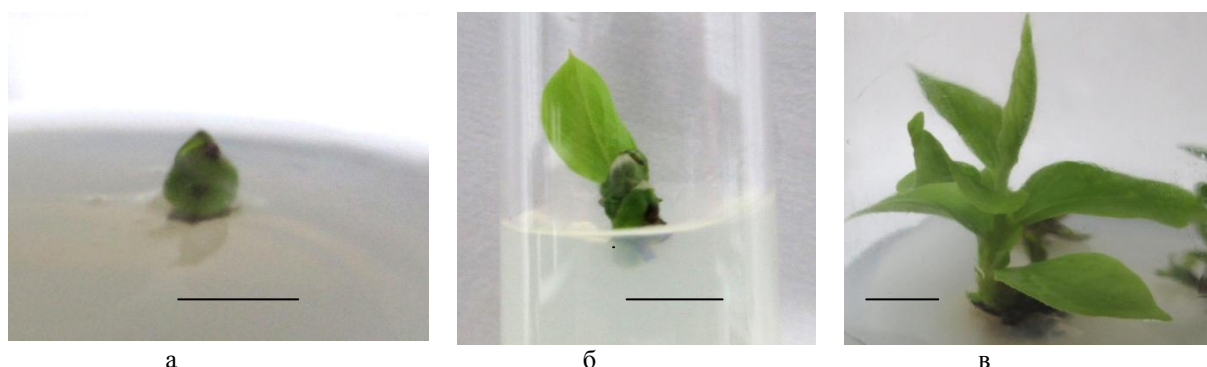


Рис. 2 Регенерация микропобегов хурмы сорта Золотистая в условиях *in vitro*: а) вегетативная почка; б) формирование розетки листьев; в) микропобег в условиях *in vitro* (масштаб 1 см)

Так при использовании 4,40 мкМ БАП наблюдали регенерацию микропобегов у 51,4% введенных вегетативных почек, при этом в присутствии 2,20 мкМ БАП в питательной среде – только у 36,3% эксплантов. Повышение концентрации БАП до 15,4-17,6 мкМ способствовало увеличению количества почек, способных к побегообразованию (84,6-86%). Однако полученные микропобеги были сильно оводненными и в дальнейшем оказались нежизнеспособными.

Микропобеги удлинялись на среде того же состава. Субкультивирование индуцировало формирование дополнительных микропобегов. Коэффициент размножения у полученных адвентивных почек через 4 недели культивирования на среде для удлинения с 4,40 мкМ БАП составлял 2,0 (табл. 1). Средняя длина микропобегов достигала $20,0 \pm 0,8$ мм. Высокое содержание БАП (6,60-8,90 мкМ) в питательной среде стимулировало образование конгломератов адвентивных микропобегов в базальной части эксплантов. Однако такие побеги были оводненными и не удлинялись. Учитывая то, что процесс микрочеренкования в условиях *in vitro* начинался с того, что каждый побег был разрезан на 2 или 3 сегмента с почкой, можно было получить более чем 5-кратное увеличение коэффициента размножения через 6-8 недель культивирования.

Таблица 1
Влияние БАП на адвентивное побегообразование хурмы сорта Золотистая в условиях *in vitro*

Концентрация БАП, мкМ	Среднее количество адвентивных микропобегов/эксплант	Средняя длина адвентивных микропобегов, мм
Контроль*	0	0
2,22	$0,5 \pm 0,3$	$10,0 \pm 0,6$
3,55	$1,6 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,7$
4,40	$2,0 \pm 0,2$	$20,0 \pm 0,8$
6,60	$2,2 \pm 0,3$	$16,0 \pm 0,6$
8,90	$2,4 \pm 0,3$	$13,0 \pm 0,4$

*Среда без цитокинина

В ряде публикаций представлены результаты исследований по использованию высечек листа [4, 9, 10], зародышей, семядолей [12] и гипокотилей [15] для регенерации хурмы *in vitro*. Нам впервые удалось индуцировать регенерацию

микропобегов из органогенного каллуса, образовавшегося на высечках листа хурмы сорта Золотистая с использованием ТДЗ.

Известно, что разработка способа регенерации микропобегов из высечек листа и сегментов побегов древесных и кустарниковых растений с применением ТДЗ позволяет не только размножать растения, но и изучать процессы морфогенеза в целом. В состав ТДЗ входит фенилмочевина, являющаяся эффективным биорегулятором, который проявляет цитокининовую активность в различных растительных системах, включая и регенерацию растений через органогенез из различных эксплантов [4]. Использование ТДЗ в наших экспериментах в концентрации от 3 до 12 мкМ позволило индуцировать непрямой органогенез из листовых эксплантов хурмы в условиях *in vitro*.

В результате исследований из высечек листа получено 4 типа каллуса: зеленый шаровидный каллус; зеленый каллус с темными зонами; темно-коричневый каллус; светло-серый рыхлый каллус. Высечки листьев, культивируемые в темноте, давали типы каллуса похожие на описанные выше, при этом каллус был белый или светло-коричневый. Вместе с тем формирование каллуса начиналось активнее в темноте. Каллус образовывался в основном в основании черешка и незначительно по краю экспланта (рис. 3).

Формирование адвентивных почек наблюдали через 4-6 недель только на поверхности зеленого шаровидного, морфогенного каллуса сначала в виде мелких блестящих зеленых структур (рис. 4), которые затем дифференцировались в микропобеги (рис. 5).



Рис. 3 Индукция каллусогенеза (через 4 недели культивирования на свету) на среде МС, дополненной 6,0 мкМ ТДЗ (масштаб 1 см)

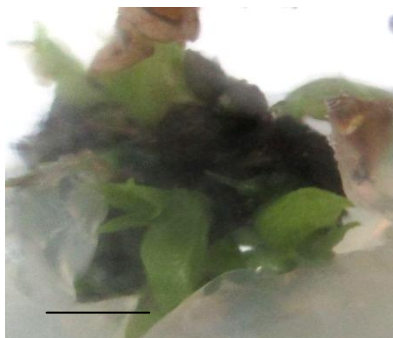


Рис. 4 Формирование адвентивны почек из морфогенного каллуса (через 6 недель культивирования на свету) (масштаб 1 см)



Рис. 5 Микропобеги хурмы сорт Золотистая на среде МС, дополненной 4,40 мкМ БАП и 0,98 мкМ ИМК (масштаб 1 см)

Частота органогенеза достигала 100% из высечек листа через 6 недель культивирования на средах 6 мкМ и 9 мкМ ТДЗ. Культивирование эксплантов свыше 6 недель приводило к регенерации микропобегов из морфогенного каллуса. В результате было получено 6-8 микропобегов хурмы сорта Золотистая на эксплант. Развившиеся микропобеги отделяли от каллуса, микрочеренковали и культивировали на среде $\frac{1}{2}$ МС, дополненной 4,40 мкМ БАП и 0,98 мкМ ИМК.

Выводы

Полученные нами экспериментальные данные показывают, что регенерация микропобегов у хурмы сорта Золотистая возможна из вегетативных почек, отобранных в состоянии покоя *ex situ*, и высечек листа, культивируемых *in vitro* микропобегов. При использовании регуляторов роста БАП и ИМК можно получить сравнительно высокую частоту побегообразования для данного сорта. Кроме того, БАП служит заменой

зеатину и представляет интерес для массового производства данной культуры. Показана эффективность ТДЗ как индуктора непрямого органогенеза в культуре высечек листа хурмы восточной сорта Золотистая.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-50-00079.

Список литературы

1. Здруйковская-Рихтер А.И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений. – Симферополь: Крым-Фарм-Трейдинг, 2003. – С.290-292.
2. Казас А.Н., Литвинова Т.В., Мязина Л.Ф. Синько Л.Т., Хохлов С.Ю., Чернобай И.Г., Шишкина Е.Г. и др. Субтропические плодовые и орехоплодные культуры: научно-справочное издание. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2012. – С. 172-191.
3. Митрофанова И.В., Казас А.Н., Хохлов С.Ю. Особенности клонального микроразмножения хурмы // Бюлл. Гос. Никит. ботан. сада. – 1998. – Вып. 80. – С. 153-158.
4. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
5. Bellini E., Giordani E. Germoplasm conservation and evaluation of *Diospyros kaki* L. within the European project «minor fruit tree species conservation» // Acta Hort. – 1997. – Vol. 436. – P. 69-76.
6. Cooper P.A., Cohen D. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) // Plant Prop Soc. – 1985. – Vol. 34. – P. 118-124.
7. Fukui H., Nishimoto K., Murase I., Nacamura M. Somatic embryogenesis from the leaf tissues continuously subcultured shoots Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) // J Jpn Soc Hort Sci. – 1988. – Vol. 38. – P. 465-469.
8. Fukui H., Sugiama M., Nakamura M. Shoot tip culture of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) // J Jpn Soc Hort Sci. – 1989. – Vol. 58. – P.43-47.
9. Kochanova Z., Onus N., Brindsa J. Adventitious shoot regeneration from dormant buds of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cv. Hachiya // Journal of Agrobiolgy. – 2011. – Vol. 28 (2). – P. 113-118.
10. Liu Y., Ma J., Tang X., Song C. Study on the adventitious shoot regeneration of persimmon leaves // Hubei Agri Sci. – 2006. – Vol. 45. – P. 618-621.
11. Mitrofanova I., Ivanova N. Biotechnological approaches of persimmon explants introduction to *in vitro* culture // Abstract Book of II. Intl. Plant Breeding Cong-ress and Eucar-pia – Oil and Protein Crops Section Conf. (November 1-5, 2015, Antalya, Turkey). Antalya, 2015. – P. 119.
12. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V. Development of recipient system of woody subtropical plants *in vitro* // Acta Univ. Latviensis Biol. – 2004. – Vol. 676. – P. 189-196.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol.15, N 3. – P. 473-497.
14. Naval M.M., Llacer G., Badenes M.L., Giordani E. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of the persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cv. «Rojo Brillante» // Acta Hort. – 2009. – Vol. 833. – P.183-186.
15. Sun Q., Sun H., Lin Q., Shi Y. Plant regeneration from hypocotyls of persimmon // Deciduous Fruits. – 2000. – Vol. 11. – P. 4-5.
16. Tao R., Murayama H., Moriguchi K., Sugiura A. Plant regeneration from callus cultures

derived from primordial leaves // Hort Science. – 1988. – Vol. 23. – P. 1055-1056.

17. *Tetsumura T.* Effect of tupes of cytokinin used vor *in vitro* shoot proliferation of persimmon on the subsequent rooting of shoots // Acta Hort. – 1997. – Vol. 436. – P. 143-148.

18. *Wood B.W.* Axillary shoot abscission in pecan and its relationship to growth regulators // Journal of American Society of Horticultural Science. – Vol. 113. – P. 713-717.

Статья поступила в редакцию 01.08.2016 г.

Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., Khokhlov S.Yu. Various regeneration ways of *Diospyros kaki* Thunb. cultivar “Zolotistaya” *in vitro* // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 24-30.

The article covers study analysis of such growth regulators influence as 6-benzylaminopurine (BAP) and indoline-3- butyric acid (IBA) on regeneration of microshoots from vegetative buds of *Diospyros kaki* Thunb., cultivar Zolotistaya. Increasing concentration of biologically active substances (BAS) significantly influenced on regeneration of microshoots and much more intensified if IBA was added into culture medium MS with half concentration of such macroelements as KNO₃ and NH₄NO₃. Maximum rate of shoots regeneration (75%) was obtained in medium ½ MS, supplied with 8,80 mkM BAS and 0,98 mkM IBA in 8 weeks after experiment was launched. The findings reveal that active regeneration of *Diospyros* microshoots *in vitro* is possible if to enrich culture medium with BAS and IBA. The article presents results of primary stages of microshoots regeneration applying leaf excision as initial explants. 6,0 and 9,0 mkM of thidiazuron (TDZ) in culture medium favored further formation of morphogenic callus and organogenesis. Based on leaf excision 6-8 *Diospyros* (“Zolotistaya” cultivar) microshoots became experiment result.

Key words: *Diospyros*; *explants*; *growth regulators*; *microshoot*; *organogenesis*

УДК 581.165

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *LABURNUM ANAGYROIDES* MEDIC.

Светлана Николаевна Тимофеева¹, Ольга Ивановна Юдакова²,
Анна Игоревна Степанова²

¹ УНЦ «Ботанический сад» Саратовского государственного университета имени
Н.Г. Чернышевского, г. Саратов
410010, г. Саратов, ул. Навашина, 1
timofeevasn@mail.ru

² Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, г. Саратов
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83
yudakovaoi@info.sgu.ru

Изучены особенности клонального микроразмножения *Laburnum anagyroides* Medic. (сем. Leguminosae) с использованием тканей сеянцев на среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП. Проведен гистологический анализ морфогенеза. Показано, что развитие пазушных и адвентивных побегов является результатом пролиферативной активности меристем первичного экспланта. Для увеличения количества получаемого посадочного материала по разработанной методике допустимо использование как пазушных, так и адвентивных побегов.

Ключевые слова: бобовник анагировидный; микроразмножение; морфогенез *in vitro*.

Введение

При озеленении городов важно учитывать не только эколого-физиологические особенности растений, но и их эстетические характеристики. Ценными декоративными показателями обладает Бобовник анагировидный или «золотой дождь» (*Laburnum*