

УКРАИНСКАЯ АКАДЕМИЯ АГРАРНЫХ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД

На правах рукописи

МИТРОФАНОВА Ирина Вячеславовна

УДК 581.143.6:631.52:634.6

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИНДУЦИРОВАННОГО МОРФОГЕНЕЗА И
РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ЗИЗИФУСА (ZIZYPHUS JUJUBA MILL.)
В УСЛОВИЯХ IN VITRO**

03.00.23 -- биотехнология

03.00.05 -- ботаника

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ялта -- 1994



00756494 (Z)

Диссертационна робота з'являється рукописною
робота виконана в відділі біотехнології Государственного
Никитского ботанического сада УААН.

Научные руководители - академик АН РМ, доктор биологических наук, профессор
А.А.Чеботарь,
академик РАСХН, доктор биологических наук, профессор
В.С.Шевелуха.

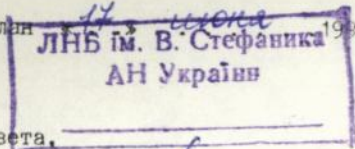
Официальные оппоненты - член-корреспондент РАН, академик РАСХН, доктор биологических наук профессор Р.Г.Бутенко,
доктор биологических наук
В.Д.Работягов.

Ведущая организация - Институт клеточной биологии и генетической инженерии
АН Украины

Защита диссертации состоится «25» июля 1994 г. в 10⁰⁰ час. на заседании специализированного совета Д 020.76.01 при Государственном Никитском ботаническом саду по адресу: 334267, Республика Крым, г.Ялта. Государственный Никитский ботанический сад.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного Никитского ботанического сада.

Автореферат разослан 14 июля 1994 г.



Ученый секретарь
специализированного совета,
кандидат биологических наук

Л. Кучерова Т.П.Кучерова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Среди субтропических культур большой интерес представляет зизифус (*Zizyphus jujuba* Mill.) семейства Крушиновые, который одновременно является пищевым и лекарственным растением. В связи с этим наблюдается тенденция к увеличению площадей насаждения зизифуса в Крыму. Использование традиционных способов размножения зизифуса (семенное и вегетативное) не может обеспечить этих потребностей. Кроме того, указанные способы имеют ряд недостатков. Так, при семенном размножении мы получаем, чаще всего гетерогенный материал. Вегетативное размножение в силу биологических особенностей культуры, трудоемко (Ядров, Синько и др., 1990).

В последние несколько десятилетий во многих странах мира нашел широкое применение новый весьма эффективный и экономически выгодный метод размножения растений - клональное микроразмножение. Известные методы клонального микроразмножения, применяемые для травянистых растений нельзя использовать без серьезных исследований для древесных пород. При размножении древесных растений *in vitro* возникает много трудностей. Они встречаются на всех этапах микроразмножения, начиная с получения стерильной культуры, дальнейшего размножения и особенно на этапе укоренения образовавшихся побегов. В тоже время этот метод позволяет ускорить селекционный процесс, получить генетически однородный высококачественный посадочный материал, и сократить длительность ювенильной фазы. Попытки решения такого рода проблем применительно к культуре зизифуса и составили основу данной работы.

Цель и задачи исследования. Основной целью работы было возможно более полное изучение морфогенетических потенций различных тканей и органов *Zizyphus jujuba* в зависимости от гормональных, трофических и физических факторов выращивания, а также физиологического состояния первичного экспланта. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- получить стерильную культуру эксплантов зизифуса;
- изучить морфогенетические потенции зизифуса *in vitro* в зависимости от генотипа, возраста исходного растения и происхождения первичного экспланта;
- изучить влияние трофических, гормональных и физических

факторов на процесс морфогенеза;

- изучить анатомию процесса образования соматических зародышей под влиянием веществ ауксинового типа действия в культуре тканей зародышей зизифуса;

- оптимизировать состав питательной среды и условий культивирования с помощью статистического анализа полученного материала;

- разработать лабораторный способ размножения зизифуса *in vitro*.

Научная новизна. Впервые детально изучены морфогенетические потенции растения зизифуса *in vitro*, определены возможные пути размножения ювенильного и взрослого растения. Изучено влияние различных факторов выращивания (состав минеральных солей, гормональный баланс среды, консистенция и pH среды) на регенерационную способность растений зизифуса. Показано, что с увеличением возраста растений, от которых получены экспланты, снижаются морфогенетические потенции культивируемых тканей и органов. Установлено, что оптимальным является использование в качестве эксплантов вегетативных почек взрослых растений или зиготических зародышей. Показано, что заложение соматических зародышей происходит в эпидермальном и субэпидермальном слоях семядолей зародыша зизифуса. С помощью статистических методов оптимизированы условия индукции развития вегетативных почек. Впервые разработан способ получения растений из соматических и зиготических зародышей зизифуса.

Практическая ценность работы. Расширены представления о морфогенетических потенциях древесных растений. На основе полученных данных о морфогенетических потенциях тканей и органов зизифуса предложен лабораторный метод получения растений из зародышей (зиготических и соматических) в условиях *in vitro*. Этот метод можно рекомендовать для получения новых селекционных и гибридных форм.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ и 3 - находятся в печати.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались на II-ом Российском симпозиуме "Новые методы биотехнологии" в 1993 г. (Пушино), на 2-ой конференции "Регуляторы роста и

развития растений" в 1993 г. ТСХА (Москва), на 2-ой международной конференции "Биология культивируемых клеток растений и биотехнология" в 1993 г. (Алматы), на конференции молодых ученых и специалистов "Актуальні питання ботаніки і екології" в 1993 г. (Ялта) и на ежегодных семинарах отдела биотехнологии и отдела цитогенетики и эмбриологии ГНБС УААН.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов и приложения. Содержит 157 страниц машинописного текста, 37 рисунков, 26 таблиц. Список литературы содержит 286 наименований, из них 241 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили зародыши и вегетативные почки 5-6- и 20-летних деревьев трех сортов зизифуса: сорт Я-цзао - мелкоплодный, сорт Китайский 2А - среднеплодный и сорт Та-ян-цзао - крупноплодный.

Плоды стерилизовали 90-95 % этиловым спиртом и обжигали в пламени спиртовки. Условия стерилизации вегетативных почек в связи с необходимостью специальных экспериментов для поиска оптимальных вариантов приводим в разделе **Результаты и обсуждения**. В работе придерживались принятых в отделе биотехнологии ГНБС принципов стерилизации питательных сред, инструментов и посуды.

В экспериментах по изучению морфогенетических потенций различных органов использовали питательную среду ПВ, содержащую макросоли по Пирику (Pierik, 1976), микросоли по Хеллеру (Heller, 1953) и витамины по Жакио (Jaquot, 1953). В зависимости от поставленной задачи к питательной среде добавляли различные биологически активные вещества, а также сахарозу в концентрациях 0,029-0,146 М. Экспланты выращивали в культуральной комнате при температуре $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 16 часовом фотопериоде, освещенности 2000-3000 лк и относительной влажности 70 %.

В экспериментах по изучению влияния факторов выращивания на побегообразование, вегетативные почки зизифуса культивировали на: 1 - агаризованной (агар 0,7 %) и жидкой (стационарная на фильтровальных мостиках в биологических пробирках); 2 - агаризованной среде с разным рН (4,2-7,2); 3 - средах с различным со-

ставом минеральных солей - соли по прописям Хеллера, В5 (Gam-borg, Eveleigh, 1968), Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) и Пирика.

Было изучено влияние веществ цитокининового типа действия (кинетин (6-фурфуриаминопурин), БАП (6-бензиламинопурин)) и ауксинового типа действия (ИМК (β -индолил-3-масляная кислота), ИУК (β -индолил-3-уксусная кислота), НУК (α -нафтилуксусная кислота)) на образование побегов из вегетативных почек зизифуса.

Для культивирования зародышей зизифуса были испытаны среды с различным составом минеральных солей: Уайта (White, 1934), Нича (Nitsch, 1969), Кнудсона (Knudson, 1925), МС (1962), Монье (Monnier, 1973). Экспланты выращивали первоначально в темноте при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30-120 суток, а затем при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 часовом фотопериоде, освещенности 2000-3000 лк и относительной влажности 70 %.

Эксперименты по изучению образования соматических зародышей проводили в три этапа. На первом и втором этапе использовали питательную среду МС, на третьем - среду ПВ. Исследуемый материал первоначально находился в темноте (термостат, температура 26°C). На втором и третьем этапе экспланты культивировали при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, освещенности 2000-3000 лк и 16 часовом фотопериоде.

Анатомическое изучения процесса заложения соматических зародышей проводили на постоянных препаратах на микроскопе "Jena-val" (ГДР). Микрофотографии срезов были сделаны с помощью фотонасадки для микроскопа мфн-11. Эта работа проводилась совместно с к.б.н. С.В.Шевченко.

Эксперименты по оптимизации условий культивирования проводили с помощью методов математической статистики в соответствии с рекомендациями В.С.Горя (1978) и Б.А.Доспехова (1985) на ЭВМ IBM-AT.

Миниатюрные растения пикировали в пластмассовые вазоны со смесью торфа и перлита (1:3). Растения содержали при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$, освещенности 3000-5000 лк и 16 часовом фотопериоде в течение 4-х месяцев.

Экспериментальная работа была выполнена в отделах биотехнологии и цитогенетики и эмбриологии Государственного Никитского ботанического сада.

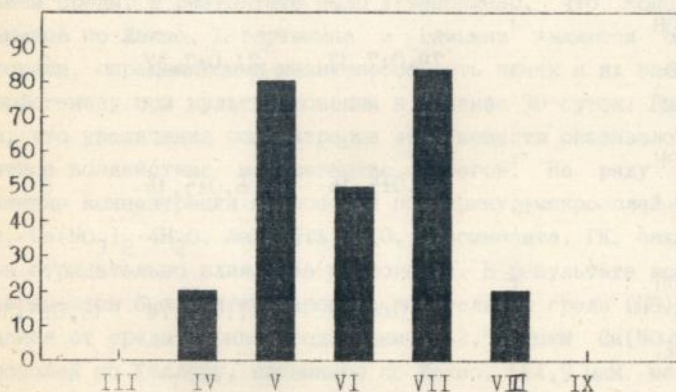
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Изучение морфогенетических потенциалов зизифуса (*Zizyphus jujuba* Mill.) в условиях *in vitro*.

Культивирование изолированных зародышей и вегетативных почек зизифуса на питательных средах, отличающихся по составу минеральных солей, концентрациями витаминов, сахарозы, а также гормональных препаратов и их соотношений, приводило к разным морфогенетическим процессам.

Культивирование вегетативных почек зизифуса *in vitro*. Способность почек зизифуса к морфогенезу сильно варьировала в течение сезона (рис.1). Так вегетативные почки, введенные в условия *in vitro* в середине апреля слабо развивались. В то время как у эксплантов, отобранных с растений в период их активного роста *in situ*, интенсивность побегообразования *in vitro* достигала 80-85%.

Развитие
побегов, %



Время взятия экспланта, месяц

Рис. 1. Зависимость развития побегов зизифуса от времени взятия экспланта

Особенности получения асептической культуры. Сравнительное изучение эффективности различных способов стерилизации вегетативных почек 5-6-летних деревьев показало необходимость ступенчатой дезинфекции тканей зизифуса, при которой почки с микроцит-

ком погружали на 10 мин в 1% раствор Timerosal, 60 сек в 70% этанол, 2-3 мин в раствор азотнокислого серебра и трижды промывали стерильной дистиллированной водой в течение 20-30 мин (табл. 1).

Таблица 1

Выход эксплантов после стерилизации различными способами недревневших побегов зизифуса

Способ стерилизации	Режим стерилизации, мин.	Количество почек, %		
		инфицированных	потемневших	развившихся
1	2	3	4	5
70% C ₂ H ₅ OH	1			
4% гипохлорит Ca	15	72,0±7,88	11,0±5,67	17,0±4,83
70% C ₂ H ₅ OH	1			
0,1% диацид	5	55,0±5,27	14,0±5,16	31,0±7,37
70% C ₂ H ₅ OH	1			
0,8% AgNO ₃	3	79,0±7,37	21,0±7,37	0
70% C ₂ H ₅ OH	1			
1% Timerosal	10	94,0±5,16	6,0±5,16	0
70% C ₂ H ₅ OH	1			
1% Timerosal	10	37,0±4,83	47,0±6,74	16,0±5,16
0,8% AgNO ₃	2-3			
1% Timerosal	10			
70% C ₂ H ₅ OH	1	4,0±5,16	0	96,0±5,16
0,8% AgNO ₃	2-3			

Оптимизация питательной среды для индукции побегообразования. Первоначально было изучено влияние минеральных солей (по MC, B5, Хеллеру, Пирику) на фоне константного содержания биологически активных веществ (БАП 4,44 мкМ, ИМК 0,05 мкМ, мезоинозит 554,93 мкМ, сахараза 0,087 М) на мофогенетические потенции куль-

тивируемых почек зизифуса. Через 7-10 суток, с момента начала культивирования почки с микроцитком, на испытанных вариантах питательных сред было отмечено начало роста побегов. В этот период на среде Хеллера образовывались единичные слабые побеги, а в основании микроцитка образовывался рыхлый бесцветный каллус. Рост побегов средней интенсивности был отмечен на среде В5, при этом в течение месяца образовывался только один побег длиной 0,4-0,6 см. Культивирование почек на среде МС не дало положительного результата. Наилучшей оказалась среда, содержащая минеральные соли по Пирику, где интенсивность побегообразования достигала 85%. Однако и в этом варианте опыта образующиеся побеги длиной 0,5-0,6 см имели светло-зеленую окраску, что побудило нас провести последующие серии экспериментов с целью повышения эффективности размножения зизифуса через культуру вегетативных почек.

Анализ полученных данных, с применением методов математической статистики позволил выявить значимые и незначимые различия в развитии побегов различных генотипов на 28 вариантах питательной среды. В результате было установлено, что концентрации витаминов по Жакио, L-глутамина и глицина являются основными факторами, определяющими жизнеспособность почек и их способность к морфогенезу при культивировании в течение 30 суток. Было показано, что увеличение концентрации этих веществ оказывало благоприятное воздействие на развитие побегов. На ряду с этим, повышение концентрации макросолей по Пирику, микросолей по Хеллеру, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaFeЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, мезоинозита, ГК, сахарозы и агара отрицательно влияло на морфогенез. В результате всей серии экспериментов была оптимизирована питательная среда (ПВ), отличающаяся от среды Пирика содержанием 2,54 мкМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, микросолей по Хеллеру, витаминов по Жакио, 554,9 мкМ мезоинозита, 6,84 мкМ L-глутамина, 26,6 мкМ глицина, 2,02 мкМ ГК и 0,116 М сахарозы, позволяющая повысить морфогенетический потенциал зизифуса.

Сравнивая по критерию Стьюдента результаты, полученные в процессе культивирования *in vitro* почек трех сортов зизифуса, выявлены незначимые различия в интенсивности регенерации побегов через 14 и 30 суток культивирования сортов Китайский 2А и Та-ян-цао. В это же время у сорта Я-цао интенсивность пролифе-

рации была сравнительно низкой.

Изучение влияния фитогормонов на активацию меристем и рост побегов. При культивировании вегетативных почек в течение 3 недель на среде ПВ с различными концентрациями веществ цитокининового типа действия БАП (0,88-4,44 мкМ) и кинетина (0,92-4,65 мкМ) были отмечены различия, связанные с активизацией развития почек и роста побегов. Так, при сравнительно низких концентрациях БАП (0,88-2,22 мкМ) число активизирующихся почек возрастало до 60 % с увеличением длины побега до 0,12 см. Увеличение концентрации БАП до 4,44 мкМ приводило к витрификации побегов. Присутствие в среде кинетина тормозило побегообразование и вызвало формирование рыхлого каллуса на поверхности почек. Наиболее хорошо сформировавшиеся побеги были получены в варианте, где в среде первоначально присутствовал БАП в концентрации 0,88 мкМ. По этой причине в последующих экспериментах БАП использовался в качестве вещества цитокининового типа действия.

Было изучено влияние генотипа, БАП и ауксинов ИМК, ИУК, НУК на регенерационную способность почек зизифуса в условиях *in vitro*. Так, у сорта Я-цзао наилучшее развитие побегов происходило при культивировании на среде ПВ с содержанием БАП 0,88 мкМ и ИМК 0,024 мкМ (табл. 2). Образовавшиеся побеги с двумя междоузлиями

Таблица 2

Влияние фитогормонов на образование побегов у сорта Я-цзао в условиях *in vitro* (наблюдение через 42 сут)

Концентрация ауксинов, мкМ	Длина побега, см			
	Концентрация БАП, мкМ			
	0,0	0,88	2,64	4,44
ИМК				
0,024	0,89 ± 0,11	0,43 ± 0,09	0,68 ± 0,08	0,65 ± 0,05
0,049	0,65 ± 0,08	1,64 ± 0,08	0,72 ± 0,07	0,78 ± 0,07
ИУК				
0,028	0,39 ± 0,04	0,69 ± 0,07	0,75 ± 0,07	0,76 ± 0,09
0,057	0,42 ± 0,03	0,95 ± 0,06	0,75 ± 0,07	0,80 ± 0,05
НУК				
0,026	0,46 ± 0,02	1,15 ± 0,06	0,33 ± 0,04	0,77 ± 0,07
0,053	1,12 ± 0,07	0,88 ± 0,03	1,61 ± 0,11	0,90 ± 0,06

* Контроль (К) - 0,52 ± 0,03

достигали в среднем длины 1,64 см. Увеличение концентрации БАП и введение в питательную среду НУК и ИУК снижало пролиферационный процесс. Аналогичные результаты были получены у сорта Китайский 2А (табл. 3). Культивирование почек сорта Та-ян-цзао на пита-

Таблица 3

Влияние фитогормонов на образование побегов у сорта Китайский 2А в условиях *in vitro* (наблюдение через 42 сут)

Концентрация ауксинов, мкМ	Длина побега, см			
	Концентрация БАП, мкМ			
	0,0	0,88	2,64	4,44
ИМК				
0,024	1,00 ± 0,08	1,42 ± 0,08	1,06 ± 0,07	0,73 ± 0,07
0,049	0,75 ± 0,06	1,36 ± 0,08	0,83 ± 0,06	0,73 ± 0,07
ИУК				
0,028	0,85 ± 0,06	0,58 ± 0,09	0,32 ± 0,04	0,66 ± 0,05
0,057	1,28 ± 0,10	0,89 ± 0,08	0,91 ± 0,06	0,71 ± 0,08
НУК				
0,026	0,72 ± 0,08	0,62 ± 0,07	0,44 ± 0,05	1,17 ± 0,13
0,053	0,86 ± 0,08	0,90 ± 0,05	0,40 ± 0,07	0,33 ± 0,04

* Контроль (К) - 0,82 ± 0,03

Таблица 4

Влияние фитогормонов на образование побегов у сорта Та-ян-цзао в условиях *in vitro* (наблюдение через 42 сут)

Концентрация ауксинов, мкМ	Длина побега, см			
	Концентрация БАП, мкМ			
	0,0	0,88	2,64	4,44
ИМК				
0,024	1,74 ± 0,06	0,55 ± 0,04	2,26 ± 0,10	0,45 ± 0,05
0,049	0,65 ± 0,09	1,41 ± 0,11	1,18 ± 0,07	0,84 ± 0,08
ИУК				
0,028	0,38 ± 0,07	0,48 ± 0,08	1,92 ± 0,09	1,32 ± 0,09
0,057	1,49 ± 0,09	2,09 ± 0,08	1,72 ± 0,08	1,35 ± 0,09
НУК				
0,026	0,75 ± 0,08	1,31 ± 0,08	2,06 ± 0,07	0,41 ± 0,06
0,053	0,67 ± 0,10	1,77 ± 0,06	0,64 ± 0,09	1,15 ± 0,07

* Контроль (К) - 1,07 ± 0,05

тельной среде, содержащей 2,64 мкМ БАП и 0,024 мкМ ИМК способствовало активному побегообразованию (табл. 4).

Результаты проведенного дисперсионного анализа показали, что все три фактора (X_1 - сорт, X_2 - БАП, X_3 - ауксин) и их взаимодействие являются значимыми величинами (табл. 5).

Таблица 5

Результаты трехфакторного дисперсионного анализа частоты побегообразования зизифуса

Источники изменчивости	SS	df	MS = SS / df	F расч.	F табл
Основные факторы					
сорт	24,21	2	12,11	252,38	19,49
БАП	8,21	3	2,73	57,04	8,53
аук	19,17	6	3,19	66,62	3,67
Взаимодействие факторов					
сорт x БАП	16,59	6	2,76	57,67	3,67
сорт x аук	19,21	12	1,60	33,37	2,30
БАП x аук	25,73	18	1,43	29,80	1,92
сорт x БАП x аук	52,13	36	1,45	30,19	1,55

НСР < 0,5

Влияние физических факторов выращивания на регенерационную способность изолированных почек *Z. jujuba* в условиях *in vitro*.
Эффективность клонального микроразмножения растений зависит не только от гормональных факторов питательной среды, но и от физических факторов выращивания. К началу наших исследований отсутствовали какие-либо сообщения, касающиеся влияния консистенции и pH среды или других физических факторов выращивания на морфогенез *Zizyphus* spp.

Результаты, приведенные в таблице 6 показывают, что замена жидкой среды на агаризованную значительно влияла на процесс побегообразования. Так, при культивировании почек зизифуса на жидкой питательной среде формировались единичные побеги и у основания микроцитка образовывался рыхлый, оводненный каллус. Иное развитие имели почки на агаризованной питательной среде. Через

2-3 недели после введения почек в культуру начиналось активное побегообразование. В зависимости от сорта длина и количество по-

Таблица 6

Влияние консистенции среды на побегообразование почек зизифуса

Консистенция питательной среды	Длина побега, см	Кол-во жизнеспособных почек, шт	Среднее кол-во побегов на одну почку, шт	Витрификация %
Жидкая		Я-цзао		
	0,18±0,02	2,0±0,08	1,0±0,04	90,0±7,50
		Китайский 2А		
	0,33±0,03	4,0±0,25	2,0±0,08	93,0±8,20
		Та-ян-цзао		
	0,36±0,03	2,0±0,06	1,0±0,04	90,0±7,50
Агаризованная		Я-цзао		
	0,95±0,11	11,0±1,05	2,0±0,06	20,0±3,10
		Китайский 2А		
	1,64±0,09	17,0±1,46	3,5±0,15	15,0±2,50
		Та-ян-цзао		
	2,16±0,14	10,0±0,95	2,0±0,08	22,0±3,20

бегов отличались друг от друга. В результате проведенных исследований агаризованная среда была принята как основная.

Более существенные различия были получены при культивировании почек зизифуса на средах с разным рН (4,2-7,2). Из таблицы 7

Таблица 7

Влияние рН среды на развития почек и побегообразование зизифуса

рН	Число почек, %		Число побегов на одну почку, шт	Интенсивность пролиферации
	развивающихся	образующих побеги		
4,2	32,0 ± 1,40	18,0 ± 0,90	1,0 ± 0,02	-
4,7	36,0 ± 1,80	30,0 ± 0,90	1,0 ± 0,02	±
5,2	84,0 ± 6,50	70,0 ± 4,50	3,0 ± 0,08	+
5,6	70,0 ± 5,60	50,0 ± 3,50	2,8 ± 0,06	±
6,0	48,0 ± 2,80	29,0 ± 1,70	1,0 ± 0,02	-
6,6	26,0 ± 1,70	0,0	0,0	-
7,2	16,0 ± 0,90	0,0	0,0	-

видно, что наиболее благоприятный pH среды, при котором 70% почек образовывало в среднем 3 побега находился в пределах 5,2-5,6. В этих условиях способность к морфогенезу возрастала примерно в 1,5 раза по сравнению с контролем (pH 5,6). Уменьшение pH до 4,2 и увеличение до 7,2 значительно снижало число почек образующих побеги.

Таким образом, консистенция среды и pH среды оказывают значительное влияние на морфогенетические потенции культивируемых тканей и органов растений.

Развитие побегов из почек 20-летних деревьев. Проведенные нами эксперименты полностью подтвердили тот факт, что ткани и органы взрослых растений обладают более низкими морфогенетическими потенциями. Так, культивируя в условиях *in vitro* почки, изолированные с 20-летних деревьев, не удалось получить стерильную культуру.

Культивирование изолированных зародышей зизифуса в условиях *in vitro*. Известно, что большинство крупноплодных сортов и гибридов зизифуса имеют недоразвитые зародыши. В связи с этим возникла необходимость изучения условий культивирования изолированных зародышей и получения полноценных растений.

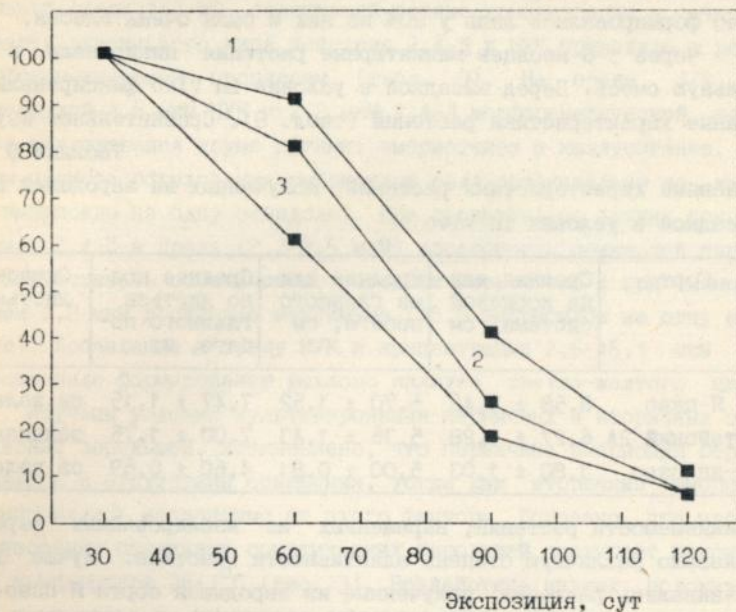
Первоначально было изучено влияние различных минеральных солей (Уайта, Нича, Кнудсона, Монье и МС) на формирование растений из зародышей зизифуса. На питательной среде Уайта наблюдали рост гипокотыля и корня. При культивировании на среде МС развитие и рост зародыша останавливались на этапе образования первых листочков. Хорошо сформировавшиеся растения были получены на питательной среде Монье из зародышей размером 6-10 мм.

Для увеличения эффективности формирования растений из зародышей в питательную среду Монье вводили фитогормоны БАП, ИМК, ИУК, НУК в различных концентрациях и сочетаниях. Контролем служила питательная среда без фитогормонов. Полученные результаты показали, что увеличение концентрации БАП в питательной среде значительно снижало число зародышей, образующих растения и вызывало их гибель. При сравнительно низких концентрациях БАП (0,44 мкМ) и ИМК (0,049 мкМ) в среде формировались светло-зеленые растения высотой 5-6 см, которые при адаптации *in vivo* поги-

бали. Из изолированных зародышей зизифуса на контрольной среде (Монье) развивались полноценные растения, высотой 8-10 см, с хорошо развитой корневой системой.

Способность зародышей к развитию в значительной степени определялась отсутствием освещенности и длительностью воздействия на них низких положительных температур (рис. 2). В этих условиях

Кол-во развившихся зародышей, %



- 1 - зародыши сорта Я-цзао;
- 2 - зародыши сорта Китайский 2А;
- 3 - зародыши сорта Та-ян-цзао.

Рис. 2. Зависимость развития зародышей от длительности воздействия низких положительных температур

в течение 30 суток происходило раскрытие семядолей. Дальнейшая экспозиция (60-120 суток) низкими положительными температурами ($5 \pm 1^{\circ}\text{C}$) оказывала отрицательное воздействие на развитие зародышей. В результате было установлено, что эффект стимуляции разви-

тия зародыша проявлялся в течение 30 сут. Для обеспечения непрерывности развития зародыша были изменены условия их культивирования (температура $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, освещенность 2000-3000 лк и фотопериод 16 часов). В течение первой недели зародыши окрашивались в зеленый цвет и начинался рост гипокотыля. Характерной особенностью зародышей сорта Я-цзао являлось отмирание главного корня в процессе его развития и формирование 3-4 боковых корней. У зародышей сорта Китайский 2А образовывался только главный корень. Корневая система растений, полученных из зародышей сорта Та-ян-цзао формировалась лишь у 20% из них и была очень слабая.

Через 5-6 месяцев миниатюрные растения пикировали в стерильную смесь. Перед высадкой в условия *in vivo* фиксировали основные характеристики растений (табл. 8). Сравнительное изучение

Таблица 8

Основные характеристики растений, полученных из зародышей перед высадкой в условия *in vivo*

Сорт	Средняя длина корневой системы, см	Средняя длина главного побега, см	Среднее количество листьев главного побега, шт	Окраска листьев
Я-цзао	$8,58 \pm 2,46$	$5,70 \pm 1,52$	$7,47 \pm 1,15$	св.зеленая
Китайский 2А	$6,27 \pm 1,28$	$5,36 \pm 1,43$	$7,00 \pm 1,75$	зеленая
Та-ян-цзао	$3,80 \pm 1,03$	$5,00 \pm 0,81$	$4,60 \pm 0,69$	св.зеленая

приживаемости растений, выращенных из изолированных зародышей показало различную степень адаптивности генотипа. Лучше других развивались растения, полученные из зародышей сорта Я-цзао. Это еще раз подтверждает высокие морфогенетические потенции зародышей мелкоплодных сортов, используемых в качестве подвойного материала. Несколько хуже адаптировались к условиям *in vivo* растения, полученные из зародышей среднеплодных и крупноплодных сортов. Возможно для их лучшей приживаемости необходимо дополнительное изучение условий адаптации (субстрат, температура, влажность, освещенность).

Исследование соматического эмбриогенеза из незрелых зиготических зародышей зизифуса в условиях *in vitro*. Эффективность соматического эмбриогенеза зависит от типа и размера экспланта,

генотипа, гормональных факторов питательной среды и физических факторов выращивания. Как показали наши исследования, эмбриониды формировались только на семядолях незрелых зародышей. Установлено, что на первичном экспланте размером 4,1-10,0 мм образовывалось максимальное количество соматических зародышей. Для индукции соматического эмбриогенеза использовали питательную среду МС с уменьшенным в два раза количеством макро- и микросолей на фоне константного содержания 0,166 М глюкозы и 3,42 мкМ L-глутамина.

Культивирование семядолей зиготических зародышей на питательной среде 1/2 МС, содержащей разные концентрации и сочетания веществ ауксинового типа действия 2,4-Д и НУК приводило к разным морфогенетическим процессам (табл. 9). На среде 1/2 МС, содержащей 2,6 мкМ НУК и 2,2 мкМ 2,4-Д морфогенетический потенциал реализовался двумя путями: эмбриогенез и каллусогенез. При этом частота образования эмбрионидов была сравнительно не высока (4 эмбриоида на одну семядолю). При сравнительно низких концентрациях 2,4-Д в среде (2,2-2,5 мкМ) способность семядолей зародыша образовывать соматические зародыши возрастала и при концентрации 2,2 мкМ достигала максимума (15,5 эмбрионидов на одну семядолю). Добавление в среду НУК в концентрации 2,6-16,1 мкМ способствовало формированию рыхлого каллуса светло-желтого цвета.

Изучены условия культивирования первичных и вторичных соматических зародышей. Установлено, что первичные эмбриониды образовывались в отсутствии освещения, тогда как вторичные эмбриониды формировались независимо от этого фактора. Показано, что частота образования первичных соматических зародышей достигает максимума при температуре $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (рис. 3). Воздействие низких положительных температур не оказывало стимулирующего влияния, как в случае с зиготическими зародышами.

В результате проведенных экспериментов, выявлена существенная роль генотипа в формировании соматических зародышей зизифуса. Так, максимальное количество эмбрионидов получено на семядолях зародыша среднеплодного сорта Китайский 2А. Последующее культивирование эмбрионидов на безгормональной питательной среде МС обеспечило прохождение ими всех стадий развития зиготического зародыша (глобулярную, сердцевидную, торпедовидную). Добавление в среду МС БАП (2,2-6,6 мкМ), кинетина (2,3-6,9 мкМ) и АБК (0,019-

ЛНБ им. В. Стефанько
Институт биологии

Таблица 9

Влияние генотипа и различных концентраций ауксинов на процессы эмбрио- и каллусогенеза

Сорт	Ауксины	Концентрация, мкМ	Экспланты сформированные со матических зародыши, N = 10	Результат		Время появления соматических зародышей сут	Время появления каллуса, сут	Кол-во соматических зародышей/семядоли зиготического зародыша, шт
				эмбриогенез	каллусогенез			
Я-цзао	2,4-Д	2,2	10	+	-	35	-	7,2 ± 1,3
		4,5	6	+	-	40	-	3,5 ± 0,3
		13,5	4	+	-	40	-	1,5 ± 0,5
	НУК	2,6	-	-	+	-	25	-
		5,3	-	-	+	-	30	-
		16,1	-	-	+	-	25	-
2,4-Д	2,2	9	+	+	30	40	2,5 ± 0,5	
	НУК	2,6						
Китайский 2А	2,4-Д	2,2	10	+	-	30	-	15,5 ± 3,5
		4,5	10	+	-	30	-	9,5 ± 1,5
		13,5	5	+	-	40	-	2,8 ± 0,1
	НУК	2,6	-	-	+	-	30	-
		5,3	-	-	+	-	30	-
		16,1	-	-	+	-	35	-
2,4-Д	2,2	5	+	+	30	30	4,0 ± 1,0	
НУК	2,6							
Та-ян-цзао	2,4-Д	2,2	9	+	-	30	-	3,0 ± 0,6
		4,5	5	+	-	30	-	2,8 ± 0,4
		13,5	4	+	-	35	-	1,5 ± 0,5
	НУК	2,6	-	-	+	-	30	-
		5,3	-	-	+	-	25	-
		16,1	-	-	+	-	30	-
2,4-Д	2,2	5	+	+	30	30	2,0 ± 0,1	
НУК	2,6							

0,075 мкМ) способствовало лишь образованию каллуса на поверхности эмбриоидов.

В результате проведенной серии опытов был подобран оптимальный состав питательной среды для формирования растений, содержащей макросоли по Пирику, микроэлементы по Хеллеру, витамины по Жакио, 0,116 М сахарозы и 6,84 мкМ L-глутамина, на которой в

Кол-во образующихся эмбрионов, %

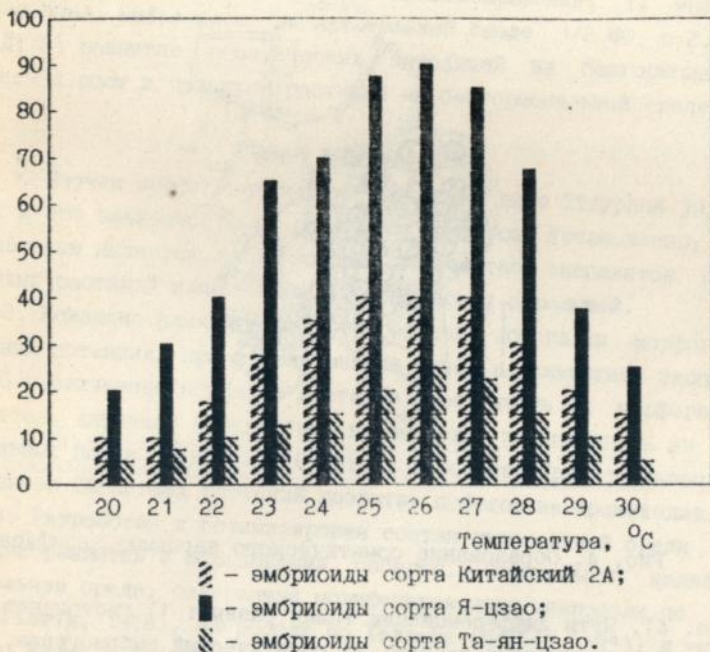


Рис. 3. Влияние температуры на частоту образования первичных соматических зародышей

течение месяца происходило увеличение семядолей эмбриода в среднем до 6 мм. В последующие 30 суток развивались корни. После того, как корни достигали длины 3,0-4,0 см начинался рост побегов. Таким образом, период формирования растений составил 3-4 месяца.

Проведенный анатомический анализ показал, что разрастание семядолей происходило, главным образом, за счет интенсивных клеточных делений, увеличения размера клеток и их вакуолизации. Клетки, расположенные по периферии семядоли были более мелкие, изодиаметрические, иногда округлые. Большая часть клеток в центре семядоли имела дегенерирующее содержимое, цитоплазма отходила от клеточной оболочки, ядро исчезало. Возможно эти клетки использовались на питание и формирование соматических зародышей

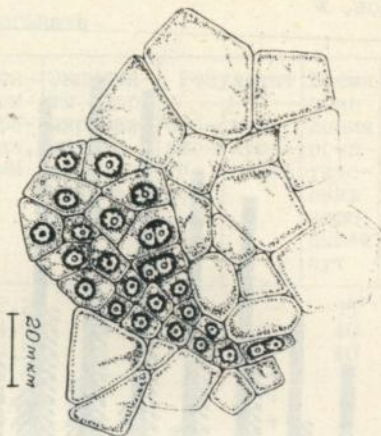


Рис. 4. Образование соматического зародыша зизифуса

(рис. 4). Пути дифференциации ткани разные: 1) гистогенез - формирование сосудистых пучков; 2) соматический эмбриогенез. Заложение эмбриондов происходило асинхронно в эпидермальном и субэпидермальном слоях семядолей. Клетки сформировавшегося глобулярного зародыша имели изодиаметрическую и округлую формы. На его поверхности наблюдали четкий эпидермальный слой. Клетки расположенные к периферии эмбриоида были мелкие, а к центру более вакуолизированные со слабо окрашенными ядрами. Через 3-4 суток после формирования глобулы на питательной среде МС с 2,2 мкМ 2,4-Д начиналось ее разрастание в базальной части по аналогии с закладкой корешка. Затем происходило образование прокамбиальных тяжей. Спустя 30-45 суток формировались нормальные эмбрионды с ярко выраженными корешком, почечкой и семядолями. Однако такое развитие по пути эмбриогенеза (появление полностью сформировавшихся соматических зародышей) не всегда происходит. Глобулы лишь вытягиваются, напоминая собой торпедовидные зародыши.

Таким образом, разработан метод получения растений из семя-

долей незрелых зародышей зизифуса путем соматического эмбриогенеза с использованием трех этапов культивирования: 1) индукция образования эмбриоидов на питательной среде 1/2 МС с 2,2 мкМ 2,4-Д; 2) развитие соматических зародышей на безгормональной среде; 3) рост и развитие растений на безгормональной среде ПВ.

ВЫВОДЫ

1. Изучен морфогенетический потенциал вида *Zizyphus jujuba* Mill. и его зависимость от различных факторов. Установлено, что оптимальным является использование в качестве эксплантов почек взрослых растений или незрелых зиготических зародышей.

2. Показано влияние возраста растения-донора на морфогенетический потенциал при использовании почек в качестве эксплантов. С увеличением возраста растения способность к морфогенезу снижается. Активное побегообразование можно индуцировать из вегетативных почек зизифуса 5-6-летних деревьев. При использовании эксплантов 20-летних растений развитие побегов не происходит.

3. Разработан и оптимизирован состав питательной среды для индукции развития и образования побегов. Оптимальной является питательная среда, содержащая модифицированные макросоли по Пиррику (Pierik, 1976), микросоли по Хеллеру (Heller, 1953) и витамины по Жакио (Jacquot, 1956). Установлено, что снижение концентрации фитогормонов оказывает благоприятное действие на интенсивность морфогенеза. Лучшие результаты были получены на среде, содержащей БАП и ИМК в концентрации 0,88 и 0,024 мкМ соответственно.

4. Зародыши зизифуса и их части обладают высоким морфогенетическим потенциалом. Они способны образовывать проростки, соматические зародыши, путем активации клеток тканей экспланта, а также морфогенный и неморфогенный каллус.

5. Установлено, что в зависимости от условий культивирования (состав питательных сред, температура, освещенность) возможна реализация двух путей получения растений из зародыша:

- через образование молодых проростков;
- через индукцию заложения соматических зародышей непосредственно в тканях культивируемых зиготических зародышей.

6. Кратковременная экспозиция низкими температурами ($5 \pm 1^{\circ}\text{C}$)

индуцирует образование проростков и тормозит соматический эмбриогенез. Для заложения первичных соматических зародышей необходимо культивирование при температуре $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ и отсутствие освещенности.

7. Анатомические исследования показали, что под действием оптимальной концентрации 2,4-Д (2,2 мкМ) заложение соматических зародышей происходит в эпидермальном и субэпидермальном слоях семядолей зародыша зизифуса. Полученные эмбриониды зизифуса проходят все стадии зиготического зародыша.

8. Разработан лабораторный способ размножения зизифуса *in vitro*, который может стать основой производственной технологии клонального микроразмножения этого вида с использованием ювенильного материала, что особенно важно для селекционных работ при контролируемом опылении.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Митрофанова И.В. Влияние БАП и ауксинов на процесс пролиферации побегов у *Zizyphus jujubu* в культуре *in vitro* // Регуляторы роста и развития растений: 2-ая конф., г.Москва, 29 июня - 1 июля 1993: Тез. докл.- Москва, 1993.- С. 50.

2. Митрофанова И.В. Действие разных фитогормонов на образование проростков из латеральных почек зизифуса // Деп. в ОНП НИЭЦ "Верас-Эко" ИЗАН Беларуси, 1993.- 10 с.

3. Митрофанова И.В., Синько Л.Т. Соматические зародыши зизифуса в культуре *in vitro* // Новые методы биотехнологии растений: II Российский симпозиум, г.Пушино, 18-20 мая 1993: Тез. докл.- Пушино, 1993. - С. 156.

4. Mitrofanova I.V., Chebotaru A.A. Special features of *in vitro* micropropagation of zizyphus // Biology of plant cell cultures and biotechnology: II International Conference, Almaty, Sep. 28- Okt. 2, 1993: Abstract.- Almaty, 1993.- P. 214.

5. Митрофанова И.В., Чеботарь А.А. К вопросу регенерации растений из незрелых зародышей зизифуса *in vitro* // Актуальні питання ботаніки і екології: Конф. молодих учених і спеціалістів, Ялта, 19-21 жовтня, 1993: Тез. докл.- Київ, 1993.- С. 84.

6. Митрофанова И.В., Шевелуха В.С. Индуцированный морфогенез зизифуса в культуре *in vitro* // Актуальні питання ботаніки і

екології: Конф. молодих учених і спеціалістів, Ялта, 19 -21 жовтня, 1993: Тез. докл.- Київ, 1993.- С. 85.

7. Митрофанова И.В. Культивирование незрелых зародышей зизифуса в условиях *in vitro* // Український ботанічний журнал. - 1994.- в печати

8. Митрофанова И.В., Чеботарь А.А., Митрофанова О.В. Влияние генотипа материнского растения и условий культивирования на способность вегетативных почек и зародышей зизифуса (*Zizyphus jujuba* Mill.) к морфогенезу *in vitro* // Физиология растений.- 1994.- 41, N 6.- в печати

9. Митрофанова И.В., Шевелуха В.С. Соматический эмбриогенез зизифуса (*Zizyphus jujuba* Mill.) в культуре *in vitro* // Известия ТСХА.- 1994.- в печати

И.В. Митрофанова

Подписано в печать 13.06.94г. Формат 84x108 1/32

Объем 1.0 п.л., Тираж 100 экз. Заказ № 3056.

Государственный Никитский ботанический сад, 334267, г.Ялта

18-11-83

457684

Ab 30.519

AB 30.519