

УДК: 634.63: 57.085.23

РЕАЛИЗАЦИЯ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ МАСЛИНЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Г.И. МЕЛИХОВА, И.В. МИТРОФАНОВА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,
Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, пгт. Никита
e-mail: *in_vitro@ukr.net*

Определены оптимальные сроки введения в культуру in vitro сегментов побега пяти сортов Olea europaea L. Разработан способ стерилизации с использованием 0,3 % раствора активного хлора, позволяющий получать асептическую культуру и снизить интенсивность каллусообразования. Показано влияние светового режима и консистенции питательной среды на морфогенез эксплантов сорта Никитская. С помощью метода эмбриокультуры получены нормально развитые проростки маслины.

Ключевые слова: маслина, микроразмножение, эмбриокультура.

Введение. Современные методы биотехнологии растений позволяют успешно размножать ценные сорта ряда субтропических плодовых культур, одной из которых является маслина европейская (*Olea europaea* L.). За последние десятилетия зарубежными исследователями были разработаны схемы размножения в условиях *in vitro* многих средиземноморских сортов маслины. Клональное микроразмножение этой культуры имеет ряд преимуществ перед такими традиционными методами, как размножение семенами и черенкование. К достоинствам метода относятся экономия временных и финансовых затрат, сокращение продолжительности ювенильного периода, благодаря чему растения в последующем раньше вступают в плодоношение, а также возможность получить в большем количестве регенеранты, генетически идентичные донорному растению [1].

Коллекция маслины, собранная в Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре, не имеет аналогов в СНГ по количеству и разнообразию представленных сортов и форм [2]. В настоящее время имеющиеся в литературе сведения об особенностях морфогенеза этих растений в условиях *in vitro* ограничиваются работами по культуре зародышей и пыльников, которые проводились в НБС-ННЦ С.В. Шевченко, В.А. Шолоховой и Л.Ф. Мязиной в 80-х годах прошлого столетия [3]. Для разработки эффективного способа клонального микроразмножения крымских сортов необходимо более подробное исследование данного вопроса.

Цель нашей работы состояла в том, чтобы выявить морфогенетический потенциал органов и тканей ценных сортов маслины в условиях *in vitro*. В задачи настоящего исследования входило получить асептическую культуру различных

© Г.И. МЕЛИХОВА, И.В. МИТРОФАНОВА, 2011

органов и тканей маслины, а также изучить особенности их развития на агаризованных питательных средах.

Материалы и методы

Объектами настоящего исследования служили перспективные сорта маслины, отобранные для введения в условия *in vitro* из коллекционных насаждений НБС – ННЦ: четыре сорта селекции НБС (Никитская, Никитская Крупноплодная, Обильная, Крымская Превосходная) и два кавказских сорта (Толгомская и Ломашенская). В качестве первичных эксплантов использовали зародыши, полученные от свободного опыления, сформированные соцветия, а также сегменты однолетних побегов с 1–3 междоузлиями. Отбор соцветий производили в июне-июле, зрелых плодов – в ноябре, а сегментов вегетативных побегов – ежемесячно, с промежутком в 1–2 недели на протяжении всего года.

Стерилизацию сегментов побега и соцветий проводили в несколько этапов. Растительный материал промывали в проточной водопроводной воде с мыльным раствором, затем ополаскивали водопроводной водой, дистиллированной водой и протирали марлевой салфеткой, смоченной в 70 % этаноле. Срезав листья, черенки помещали в стерильные стаканы и пос-

ледовательно обрабатывали растворами стерилизующих агентов (табл. 1).

Плоды маслины протирали марлевой салфеткой, смоченной в 70 % этаноле, обрабатывали 96 % этиловым спиртом, обжигали в пламени спиртовки, после чего удаляли околоплодник и извлекали зародыш.

Экспланты, прошедшие стерилизацию, в асептических условиях помещали в пробирки на агаризованную питательную среду. Сегменты побега длиной 0,7–3,7 см вводили на базовую среду WPM [4], дополненную регуляторами роста: 0,056 мкМ БАП, 0,002 мкМ НУК и 0,017 мкМ ГК₃ (рН 5,4). Субкультивирование эксплантов на свежую питательную среду осуществляли каждые 3–4 недели.

Образовавшиеся микропобеги с 2–4 листьями отделяли скальпелем и переносили на свежую агаризованную среду. Кроме того, микропобеги сортов Никитская, Никитская Крупноплодная и Толгомская культивировали на жидкой среде того же состава. В этом случае экспланты помещали вертикально либо горизонтально на мостики из фильтровальной бумаги, наполовину погружённые в питательную среду

Зародыши помещали на агаризованную среду Монье [5] без регуляторов роста.

Таблица 1. Схемы стерилизации первичных эксплантов маслины

Этап стерилизации	Стерилизующий раствор	Название препарата, производитель	Экспозиция	
Схема 1	1	70 % C ₂ H ₅ OH	Септол, Украина	1 мин
	2	1,25–5 % NaClO	Domestos, Великобритания	5–15 мин
	3	5-кратная промывка в дистиллированной воде		
	4	0,1 % Thimerosal	Merk, Германия	5 мин
	5	5-кратная промывка в дистиллированной воде		
Схема 2	1	70 % C ₂ H ₅ OH	Септол, Украина	1 мин
	2	0,15–0,3 % Cl ₂	ДезТаб, Украина	5–15 мин
	3	5-кратная промывка в дистиллированной воде		

Пробирки с эксплантами переносили в культуральную комнату с температурой 24 ± 1 °С, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2000–3000 лк (белый свет). Сегменты побега сорта Никитская, введённые в культуру *in vitro* в августе-октябре, выращивали также под лампами красного света и в темноте на протяжении 4 недель. Зародыши подвергали стратификации в темноте при температуре 0–5 °С. Спустя 11–13 недель проростки, длина корешков которых составляла не менее 4–5 см, пересаживали на свежую питательную среду, заглубляя корешок, а затем пробирки переносили в культуральную комнату на белый свет.

Обработку результатов экспериментов производили при помощи методов статистического анализа: методы первичной статистической обработки данных, однофакторного дисперсионного анализа [6]. В таблице 3 приведены средние арифметические и ошибки репрезентативности. Повторность опыта была не менее пятикратной.

Результаты и обсуждение

Использование соцветий в качестве первичных эксплантов не дало положительных результатов: экспланты этого типа значительно повреждались под действием антисептиков и полностью отмирали спустя 2–3 суток с момента введения на агаризованную среду. Морфогенетические потенции сегментов вегетативных побегов проявлялись в формировании микропобегов из пазушных почек (у всех сортов, кроме сорта Обильная), а также в образовании рыхлого каллуса на месте среза или отпадения листовых черешков.

Известно, что для получения асептической культуры органов и тканей маслины чаще всего применяют растворы антисептиков, содержащих хлор: гипохлориты натрия и кальция, сулему, соляную кислоту [7, 8, 9]. Среди испытанных нами антисеп-

тиков препарат «ДезТаб», выделяющий при растворении активный хлор [10], оказывал более щадящее действие на сегменты побега исследуемых сортов маслины, чем применявшиеся нами ранее растворы гипохлорита натрия и сулемы. В частности, жизнеспособность первичных эксплантов сорта Никитская, введённых на агаризованную среду в августе, составляла 20 % после обработки 0,3 % активным хлором и лишь 7 % после обработки 1,25 % NaClO (табл. 2).

Таблица 2. Экспланты маслины сорта Никитская после стерилизации растворами гипохлорита натрия и активного хлора

Антисептик, экспозиция	Количество эксплантов, %				
	стерильных	образовавшихся каллус	образовавшихся микропобегов		
			всего	ИК	Ж
1,25 % NaClO 3 мин	76,7	53,4	13,3	6,7	6,6
0,3 % Cl ₂ 5 мин	68,0	28,0	24,0	4,0	20,0

Примечание. Здесь и в табл. 3: ИК – количество микропобегов, развитие которых ингибировано каллусом; Ж – жизнеспособных

Таблица 3. Выход эксплантов маслины сорта Никитская при разных режимах стерилизации 0,3 % раствором активного хлора

Экспозиция антисептика, мин	Количество эксплантов, %					
	стерильных	образовавшихся каллус	образовавшихся микропобегов			
			всего	ИК	И	Ж
5,5	69,3	42,3	23,1	3,9	3,8	15,4
7,5	65,4	38,5	26,9	3,8	7,7	15,4
10,0	72,7	31,8	22,7	0	0	22,7

Примечание: И – инфицированных

Длительность воздействия стерилизующего агента также влияла на способность первичных эксплантов маслины к морфогенезу *in vitro*. В табл. 3 представлены результаты эксперимента на примере сорта Никитская.

Обработка сегментов побега данного сорта 0,3 % раствором активного хлора в течение 5,5–10 минут позволила получить от 65 % до 73 % стерильных эксплантов. Хорошие результаты были получены при экспозиции антисептика 10 минут. Интенсивность образования эксплантами каллуса при этом режиме стерилизации была ниже всего и составила 32 %, а количество эксплантов, способных к образованию микропобегов и сохраняющих жизнеспособность в течение первых 2 месяцев культивирования, достигло 23 %.

Жизнеспособность сегментов побега маслины на среде WPM зависела как от генотипа, так и от сроков введения в культуру *in vitro* (рис. 1). Среди исследуемых сортов наибольшей способностью к морфогенезу обладали экспланты сорта Никитская. Так, частота формирования микропобегов варьировала от 16 % в июле до 85 % в декабре. У остальных сортов этот показатель не превышал 71 %. Низкая регенерационная способность была отмечена у эксплантов сорта Крымская Превос-

ходная. Микропобеги у данного сорта образовывались только у 25 % эксплантов, введённых в культуру *in vitro* в декабре. У сорта Обильная экспланты не формировали микропобегов ни в одном из вариантов опыта. Это может быть вызвано неудовлетворительным состоянием растений-доноров, произрастающих в условиях ограниченного полива.

В литературе имеются сведения о том, что красный свет (длина волны 650 нм) оказывает стимулирующее действие на развитие меристем древесных растений в условиях *in vitro* [11], однако в наших экспериментах положительного эффекта не было достигнуто. Рост микропобегов сорта Никитская на белом и красном свете в течение первых двух недель культивирования существенно не различался. Вместе с тем на третьей неделе у части эксплантов наблюдали приостановку роста вследствие интенсивного образования каллуса у оснований пазушных побегов. Так, низкую частоту образования каллуса (31 %) отмечали при освещении лампами белого све-

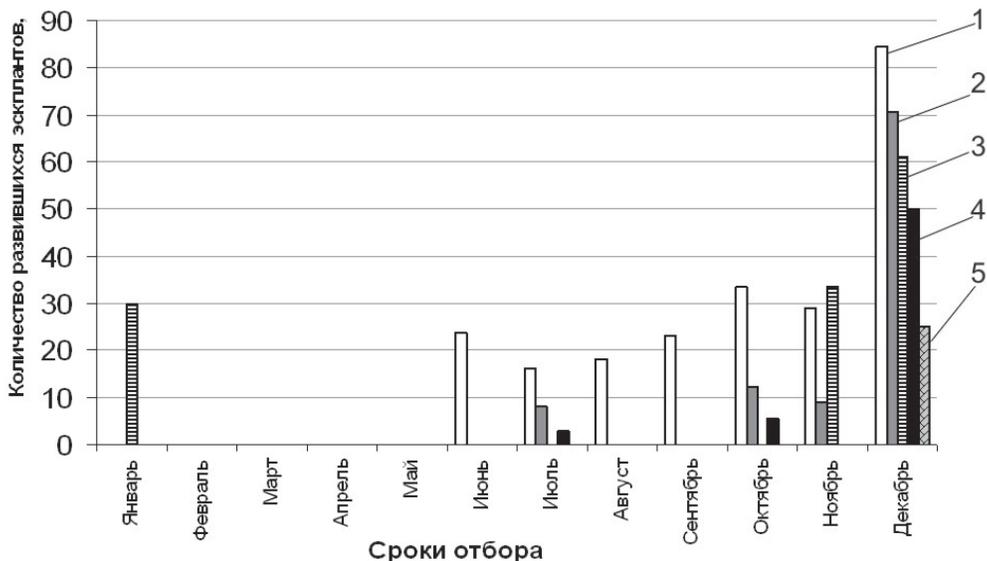


Рис 1. Зависимость жизнеспособности первичных эксплантов 5-ти сортов маслины от сроков отбора в 2010 году: 1 – Никитская; 2 – Никитская Крупноплодная; 3 – Толгомская; 4 – Ломашенская; 5 – Крымская Превосходная

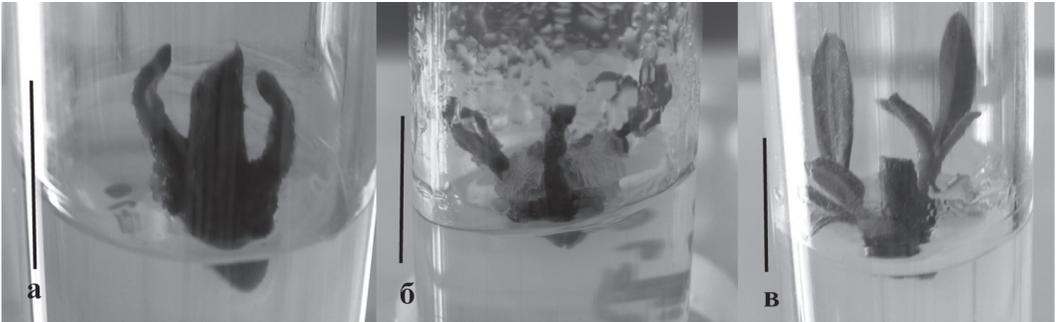


Рис. 2. Экспланты сорта Никитская после 28 сут культивирования при разных световых режимах: а – в темноте; б – на красном свету; в – на белом свету (длина линейки 1 см)

та, высокую (100 %) – при культивировании в темноте. Наряду с этим большинство микропобегов на эксплантах, подвергавшихся воздействию красного света (75 %), а также все экспланты, находившиеся в темноте, отмирали спустя 28 суток после введения на агаризованную среду. Результаты эксперимента представлены в таблице 4 и на рисунке 2.

Субкультивирование микропобегов на свежую агаризованную среду WPM, дополненную БАП и НУК, в наших опытах приводило к остановке роста и отмиранию эксплантов во втором-третьем пассаже. Выращивание микропобегов на жидкой среде того же состава оказывало различное влияние на экспланты исследуемых

Таблица 4. Влияние светового режима на морфогенез *in vitro* сегментов побега сорта Никитская

Световой режим выращивания	Прирост микропобегов за 1 месяц, см	Частота образования каллуса, %	Количество эксплантов, сохранивших жизнеспособность в течение 1 месяца, %
Белый свет	0,30±0,04	31	54
Красный свет	0,34±0,03	81	25
Без освещения	0	100	0

сортов. Все экспланты сорта Толгомская сохраняли жизнеспособность, однако прекращали расти. В то же время микропобеги сорта Никитская размером 0,5–0,7 см утрачивали тургор, темнели и отмирали спустя 15–20 суток с начала эксперимента, а экспланты размером 1 см и более оставались зелеными. В базальной части микропобегов этих двух сортов отмечено образование компактного каллуса зеленого цвета. У сорта Никитская Крупноплодная в течении первых 20 суток опыта наблюдали интенсивное образование рыхлого неморфогенного каллуса на месте прикрепления черешков листьев, что вызывало последующую гибель экспланта.

Результаты наших опытов по эмбриокультуре подтверждают имеющуюся в литературе информацию о том, что зародыши маслины при проращивании *in vitro* не

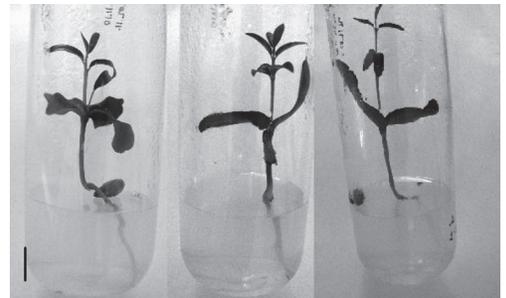


Рис. 3. Проростки маслины, полученные в культуре изолированных зародышей, спустя 3,5 месяца культивирования на среде Монье (длина линейки 1 см)

нуждаются в периоде покоя [3]. Так, спустя 30 суток стратификации происходило увеличение размеров зародышей, полученных от сортов Никитская, Толгомская и Ломашенская, спустя 42 суток – сортов Обильная и Крымская Превосходная.

Согласно литературным данным, в культуре зародышей маслины нередко происходит интенсивное формирование каллуса, а также первичный и вторичный соматический эмбриогенез [3, 12, 13]. Однако в нашем эксперименте развитие зародышей шло по пути формирования нормальных проростков. На 7-й неделе культивирования у 75–100 % зародышей появлялся зародышевый корешок. После этого полное раскрытие семядолей наблюдали в течении 4–6 суток, а появление первой пары настоящих листьев – через 7–10 суток после выставления пробирок с проростками на свет. Растения, полученные путём культуры зародышей, материнскими формами которых были сорта Обильная и Никитская, отличались быстрым развитием и спустя 3,5 месяца от начала эксперимента имели по 3–4 пары настоящих листьев, основной корень и массу корешков второго и третьего порядка (рис. 3).

Выводы

Установлено, что жизнеспособность и регенерационный потенциал сегментов вегетативных побегов маслины, введённых на агаризованную питательную среду, зависела от режима стерилизации, генотипа, типа и времени отбора эксплантов. Оптимальными сроками введения в культуру *in vitro* сегментов побега для сорта Толгомская были месяцы с ноября по январь, для сортов Никитская Крупноплодная, Крымская Превосходная и Ломашенская – декабрь, а для сорта Никитская – период с октября по декабрь. Использование в качестве антисептика 0,3 % раствора активного хлора позволи-

ло значительно снизить каллусообразование у первичных эксплантов исследуемых сортов по сравнению с предыдущими опытами. Установлены основные пути морфогенеза 6 сортов маслины крымской и кавказской селекции в условиях *in vitro*: непосредственная регенерация из вегетативных почек, каллусообразование и развитие зародышей. Среди испытанных нами световых режимов выращивания оптимальным было культивирование эксплантов на белом свете. Применение метода эмбриокультуры позволило в течение 3,5 месяцев получить из зародышей маслины проростки, способные к адаптации к условиям *in vivo*.

Список литературы

1. Rugini E., Gutierrez-Pesce P., Spampinato P.L., Ciarmiello A., D'Ambrosio C. New perspective for biotechnologies in olive breeding: morphogenesis, *in vitro* selection and gene transformation // Acta Horticulturae. – 1999. – №474. – P. 107–110.
2. Мязина Л.Ф. Состояние генофонда и селекционный потенциал маслины в Никитском ботаническом саду // Проблемы формирования генетических коллекций плодовых, ягодных культур и перспективы их селекционного использования: Мат. XXI Мичуринских чтений, 28–30 октября 2002. – Мичуринск. – 2002. – С. 47–48.
3. Шевченко С.В., Шолохова В.А., Мязина Л.Ф. Эмбриокультура маслины европейской (*Olea europaea* L., сем. Oleaceae) // Бюллетень Гос. НБС. – Ялта, 2009. – Вып. 99. – С. 97–100.
4. Lloyd G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // Proc. Int. Plant Prop. Soc. – 1980. – Vol. 30. – P. 420–427.
5. Monnier M. Croissance et développement des embryons globulaires de *Capsella bursa-pastoris* cultivés *in vitro* dans du milieu a base d'une nouvelle solution minerale // Bull. Soc. Bot. France Memories, Coll. Morphologie. – 1973. – P. 179–194.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
7. Khan M.R., Rashid. H., Quraishi A. *In vitro* shoot development from juvenile cuttings of field-grown olive (*Olea europaea* L.) cv. Leccino // On Line Journal of Biological Sciences. – 2002. – Vol. 2. – №7. – P. 438–440.

8. Rama P., Pontikis C.A. *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea sativa* L.) "Kalamon" // The Journal of Horticultural Science. – 1990. – Vol. 65. – №3. – P. 347–353.
9. Varlaro M.E., Casacchia T., Alfei B., Briccoli Bati C. *In vitro* adaptability of some Italian olive genotypes // Acta Horticulturae. – 2009. – №812. – P. 125–128.
10. Инструкция № 9/09 по применению дезинфицирующего средства «ДезТаб» (производство «АХ-ЛОР ДОНГЕ ЛТД», КНР) / Федорова Л.С., Пантелеева Л.Г., Цвириова И.М. и др. – М., 2009. – 13 с.
11. Ahuja M.R. Micropropagation of Woody Plants. – Berlin: Springer, 1992. – 536 p.
12. Maalej M., Drira N., Chaari-Rkhis A., Trigui A. *In vitro* germination of three Tunisian olive varieties // Acta Horticulturae. – 2002. – №586. – P. 903–906.
13. Rugini E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Olive (*Olea europaea* L.) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1988. – Vol. 14, №3. – P. 207–214.

Представлена В.А. Кунахом
Поступила 25.03.2011

РЕАЛІЗАЦІЯ МОРФОГЕНЕТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ОРГАНІВ І ТКАНИН МАСЛИНИ ЄВРОПЕЙСЬКОЇ В УМОВАХ *IN VITRO*

Г. І. Мелихова, І. В. Митрофанова

Нікітський ботанічний сад – Національний науковий центр,
Україна, 98648, АР Крим, м. Ялта, смт Нікіта
e-mail: in_vitro@ukr.net

Визначені оптимальні строки введення у культуру *in vitro* сегментів пагона п'яти сортів *Olea europaea* L. Розроблений спосіб стерилізації

експлантів з використанням 0,3 % розчину активного хлору дозволив одержати асептичну культуру і знизити інтенсивність калюсоутворення. Наведено вплив світлового режиму та консистенції поживного середовища на морфогенез експлантів сорту Нікітская. За допомогою методу ембріокультури одержані нормально розвинені проростки маслини.

Ключові слова: маслина, мікророзмноження, ембріокультура

MORPHOGENIC POTENTIAL REALISATION OF ORGANS AND TISSUES IN EUROPEAN OLIVE *IN VITRO*

G. I. Melikhova, I. V. Mitrofanova

Nikita Botanical Gardens – National Scientific
Center,
Ukraine, 98648, Crimea, Yalta, Nikita
e-mail: in_vitro@ukr.net

The optimal terms of introduction into *in vitro* conditions of shoot segments from five cultivars of *Olea europaea* L. have been determined. The method of shoot segments sterilization with 0,3 % active chlorine allows to obtain the aseptic culture and to reduce the callusogenesis. The influence of the light conditions and the culture medium consistency on the morphogenesis of the explants in cv. Nikitskaya has been showed. The normally developed olive seedlings have been obtained by the method of embryoculture.

Key words: olive, micropropagation, embryoculture