

10. Чеченева Т.Н. Спонтанная и индуцированная изменчивость кукурузы *in vitro*. 03.00.15 — генетика. Диссертация на соискание уч. ст. д.б.н.— Киев, 2003.— 302 с.

11. Trick H.N., Finner J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation // Transgenic Res.— 1997.— 6.— P. 329–336.

12. Hansen G. Evidence for *Agrobacterium*-Induced Apoptosis in Maize Cells // Molecular Plant-Microbe Interactions.— 2000.— 13, №6.— P. 649–657.

Резюме

Исследовали морфогенный потенциал инбредных линий кукурузы, используя в качестве эксплантов узелковый сегмент побега проростков, а также компетентность морфогенного каллуса к агробактериальной инфекции. Показана генотипическая зависимость реализации морфогенетического потенциала и интродукция Т-ДНК в геном независимо от проанализированных условий инокуляции (концентрация агробактерии, время инокуляции, ультразвуковая обработка).

Досліджували морфогенний потенціал інбредних ліній кукурудзи, використовуючи в якості експлантів вузелковий сегмент пагону проростків, а також компетентність морфогенного калусу до агробактеріальної інфекції. Показані генотипова залежність реалізації морфогенного потенціалу й інтродукція Т-ДНК в геном незалежно від проаналізованих умов инокуляції (концентрація агро бактерії, час инокуляції, ультразвукова обробка).

Maize (*Zea mays* L.) inbred lines morphogenic potential using as explant seedling nodal segment and competence of morphogenic callus to *Agrobacterium* infection were studied. Genotype dependence morphogenetic potential realization and introduction T-DNA in genome independently from analyzed conditions of inoculation (agrobacterium concentration, time of inoculation, sonication) were shown.

МЕЛИХОВА Г.И., МИТРОФАНОВА И.В.

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

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ СЕГМЕНТОВ ПОБЕГА И ИНДУКЦИИ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* МАСЛИНЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ (*OLEA EUROPAEA* L.)

Маслина европейская (*Olea europaea* L.) — одно из древнейших культурных растений. Плоды маслины и получаемое из них оливковое масло — ценные легкоусвояемые диетические продукты питания, обладающие терапевтическим действием. В Никитском ботаническом саду собрана единственная в Украине и одна из крупнейших в СНГ коллекция, насчитывающая 228 сортов и гибридов маслины [2, 4].

При использовании традиционных методов размножения (прививка, черенкование) количество получаемых растений маслины невелико, к тому же черенки многих сортов трудно и долго укореняются. Результаты исследо-

ваний последних лет показали, что успешное размножение маслины возможно с применением методов культуры органов и тканей. Многие учёные Италии, Греции и других стран занимались разработкой и совершенствованием биотехнологических способов размножения маслины [5–7, 9]. Большинство работ по культуре органов и тканей касались сортов средиземноморского происхождения. В 80-х годах прошлого столетия для получения новых сортов в НБС-ННЦ были начаты работы по эмбриокультуре маслины [3]. Однако особенности морфогенеза *in vitro* крымских сортов маслины до настоящего времени не исследованы.

Целью нашей работы было выявить морфогенетический потенциал органов и тканей ценных сортов маслины селекции НБС на начальных этапах их культивирования в условиях *in vitro*. В задачи исследования входило получение асептической культуры и изучение особенностей развития первичных эксплантов на агаризованной среде.

Материалы и методы

Объектами настоящего исследования служили два перспективных сорта маслины из коллекционных насаждений НБС — ННЦ: Никитская и Никитская Крупноплодная. Отбор растительного материала осуществляли с мая по август 2009 г. с промежуток в 1–2 недели. Стерилизацию сегментов побега проводили в несколько этапов. Растительный материал промывали в проточной водопроводной воде с мыльным раствором, ополаскивали проточной водопроводной водой, затем дистиллированной водой и протирали марлевой салфеткой, смоченной в 70%-ном этаноле. В качестве первичных эксплантов использовали верхушки и сегменты однолетних побегов с 1–3 междоузлиями. Срезав листья, экспланты помещали в стерильные стаканы и последовательно обрабатывали растворами стерилизующих агентов (табл. 1).

Экспланты помещали в 70%-ный C_2H_5OH , затем применяли 2,5%-ный раствор гипохлорита натрия либо 0,1%-ный раствор сулемы. Для повышения эффективности стерилизации в растворы антисептиков добавляли детергент Tween-80 (1–2 капли).

Экспланты, прошедшие стерилизацию, в асептических условиях высаживали в пробирки на агаризованную питательную среду. Длина эксплантов

Таблица 1

Схема стерилизации первичных эксплантов маслины

Этап стерилизации	Стерилизующий раствор	Производитель	Экспозиция
1	70% C_2H_5OH	Септол, Украина	1 мин
2	2,5% $NaClO$	Domestos, Великобритания	1; 1,5; 5 мин
	0,1% $HgCl_2$	Sigma, США	40с; 1; 2; 5 мин
3	5-кратная промывка в стерильной дистиллированной воде		
4	0,1% Thimerosal	Merk, Германия	5 мин
5	5-кратная промывка в стерильной дистиллированной воде		

в зависимости от количества междоузлий составляла 0,7–3,7 см. В качестве базовой среды использовали среду Мурасиге и Скуга [8], pH 5,2, с добавлением регуляторов роста: БАП и ГК. Субкультивирование эксплантов на свежую питательную среду осуществляли каждые 6 недель. Пробирки с эксплантами помещали в культуральную комнату с температурой 24±1 °С, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2000–3000 лк.

Обработку результатов экспериментов производили при помощи методов статистического анализа: методы первичной статистической обработки, однофакторного дисперсионного анализа [1]. В таблице 3 приведены средние арифметические и ошибки репрезентативности. Повторность опыта была не менее 10-кратной.

Результаты и обсуждение

Стерилизация является одним из самых сложных этапов при разработке биотехнологических приёмов размножения растений. Известно, что для получения асептической культуры маслины применяются следующие стерилизующие агенты: этанол, аскорбиновая кислота, NaClO, HgCl₂, HCl [5, 6, 9].

В наших исследованиях стерилизация оказывала различное воздействие на экспланты исследуемых сортов маслины (табл. 2).

Так, стерилизацию 0,1%-ным раствором сулемы (не более 40 с) хорошо перенесли сегменты побегов сорта Никитская Крупноплодная, у 53% которых на 2–3-й неделе культивирования отмечали образование микропобегов, тогда как после стерилизации гипохлоритом натрия (5 мин) — лишь у 22%. Контаминация эксплантов Никитской Крупноплодной при данных режимах обработки антисептиками составила 27% и 64% в вариантах с сулемой и гипохлоритом натрия соответственно.

Таблица 2

Выход эксплантов маслины (%) после стерилизации 0,1%-ным раствором сулемы и 2,5%-ным раствором гипохлорита натрия

		Сорт	Экспозиция											
			5 мин			1,5-2 мин			1 мин			40 с		
			Ин	Пт	Об	Ин	Пт	Об	Ин	Пт	Об	Ин	Пт	Об
Антисептики	0,1% HgCl ₂	Никитская	17	66	17	0	100	0	9	82	9	55	30	15*
		Никитская Крупноплодная	0	100	0	25	75	0	0	100	0	27	20	53
	2,5% NaClO	Никитская	23	4	73	-	-	-	0	100	0	-	-	-
		Никитская Крупноплодная	64	14	22	0	100	0	33	77	0	-	-	-

Примечание: Ин — инфицированных; Пт — потемневших; Об — образовавших побеги; (*) — формирования каллуса, ингибирующего развитие микропобегов и отмирание экспланта; (-) — опыт не проводился.

Для сорта Никитская результаты стерилизации улучшались при использовании 2,5%-ного раствора гипохлорита натрия (5 мин). Развитие пазушных побегов после стерилизации гипохлоритом натрия происходило у 73% эксплантов, в то время как после стерилизации сулемой — только у 22%. При превышении экспозиции обработки стерилизующими растворами происходило потемнение и отмирание эксплантов в течение 2–3 недель после введения в пробирочную культуру, при снижении — увеличивалась частота контаминации. Однако, по имеющимся литературным данным, сегменты однолетних побегов маслины сорта Kalamon сохраняли жизнеспособность после обработки 10%-ным раствором NaClO в течение 10 минут [6]. Следовательно, реакция первичных эксплантов маслины на стерилизацию тем или иным антисептиком носит сортоспецифичный характер.

В таблице 3 представлены результаты эксперимента по инициации развития в условиях *in vitro* первичных эксплантов сортов Никитская и Никитская Крупноплодная, отобранных в июле 2009 г.

У сохранивших жизнеспособность эксплантов на 7–10-е сутки культивирования происходила активизация развития пазушных почек. Частота индукции развития меристем на эксплант для обоих сортов составило в среднем 65–70%. При использовании верхушек побегов с 2–3 междоузлиями было отмечено развитие микропобегов только из пазушных меристем, но не из апикальных. Верхушки побегов в течение 3 недель засыхали и отмирали, или были отделены от жизнеспособной части экспланта рыхлым каллусом.

Среди эксплантов сорта Никитская, обработанных разными стерилизующими агентами, в течение четырёх недель культивирования не было выявлено существенного различия по скорости роста микропобегов. Однако на пятой неделе культивирования в варианте опыта с сулемой произошло отделение микропобегов от основного экспланта и отмирание эксплантов вследствие интенсивного нарастания каллуса. Каллус рыхлый, полупрозрачный, жёлтой или светло-зелёной окраски, формировался на местах среза

Таблица 3

Формирование микропобегов первичными эксплантами маслины

Сорт	Размер первичных эксплантов, см	Анти-септик	Количество развившихся почек на эксплант, %	Длина микропобегов, см		
				2 недели	4 недели	6 недель
Никитская	1,0-3,7	NaClO	67,3±5,0	0,28±0,01	0,47±0,02	0,67±0,08
		HgCl ₂	64,9±4,3	0,31±0,08	0,50±0,10	—*
Никитская Крупноплодная	1,3-3,2	NaClO	75,0±7,4	0,52±0,08	1,17**±0,18	1,75**±0,23
		HgCl ₂	69,2±10,3	0,49±0,10	0,61±0,07	0,89±0,12

Примечание: (*) — формирования каллуса, ингибирующего развитие микропобегов и отмирание экспланта; (**) — величина достоверно отличается от результата в варианте с сулемой (p=0,95).

или отделения листового черешка. В варианте с гипохлоритом натрия микропобеги продолжали нормально развиваться без образования или с образованием незначительного количества каллуса, и спустя 6 недель с момента введения эксплантов в условия *in vitro* они достигали в среднем длины $0,67 \pm 0,08$ см.

Для эксплантов сорта Никитская Крупноплодная влияние антисептиков на формирование микропобегов было отмечено начиная с 4-й недели культивирования. В варианте с гипохлоритом натрия микропобеги росли быстрее, чем в варианте с сулемой. Спустя 6 недель культивирования длина микропобегов на эксплантах, обработанных раствором гипохлорита натрия, составила в среднем $1,75 \pm 0,23$ см и раствором сулемы — $0,89 \pm 0,12$ см.

Полученные микропобеги спустя 6 недель с момента введения в культуру *in vitro* черенковали на сегменты длиной 0,3–1,0 см с разным количеством междоузлий и субкультивировали на свежую среду. Верхушки микропобегов с 2–3 листьями, а также сегменты длиной до 0,5 см с 1 междоузлем и 2 листьями погибли спустя 2 недели после субкультивирования. В то же время характерной особенностью эксплантов длиной 0,5–1,0 см, имеющих 2–4 междоузлия и не менее 4 листьев, была 100% жизнеспособность.

У субкультивированных микропобегов уже в первом пассаже произошла приостановка роста. В течение 7 недель культивирования развитие пазушных почек наблюдали только у 7% эксплантов сорта Никитская, причём вновь образовавшиеся побеги прекращали расти, достигнув длины 0,3–0,4 см. В базальной части микропобегов обоих сортов формировалось утолщение из плотного тёмно-бурого каллуса. Во втором пассаже роста также не отмечали, но происходило постепенное отмирание побегов, что могло быть вызвано длительным промежутком между пассажами (1,5 месяца) и истощением ресурсов питательной среды. Исследования продолжаются.

Выводы

1. Выбор способа стерилизации влиял на жизнеспособность первичных эксплантов исследуемых сортов маслины. Так, для обработки сегментов побега сорта Никитская Крупноплодная предпочтительно использовать 0,1%-ный раствор сулемы в течение 40 с, а для сорта Никитская — 2,5%-ный раствор гипохлорита натрия в течение 5 мин. Последствие гипохлорита натрия на рост и развитие микропобегов исследуемых сортов маслины было менее ингибирующим по сравнению с сулемой.

2. Скорость роста микропобегов сорта Никитская Крупноплодная в нулевом пассаже была выше, чем у сорта Никитская при аналогичных режимах стерилизации.

3. Для сохранения жизнеспособности эксплантов необходимо увеличить частоту субкультивирований, а также подобрать оптимальные концентрации регуляторов роста в среде для развития микрочеренков и микропобегов.

Литература

1. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов.— М.: Высшая школа, 1990.— 352 с.

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 ГНБС. — 2009. — Вып.99. — С. 97–100.

4. Шолохова В.А. Селекция маслины в Никитском ботаническом саду // Бюллетень ГНБС. — Вып.3 (46) — 1981. — С. 53–66.

5. Khan M.R., Rashid. H., Quraishi A. *In vitro* shoot development from juvenile cuttings of field-grown olive (*Olea europaea* L.) cv. Leccino // OnLine Journal of Biological Sciences. — 2002. — Vol.2. — №7. — P. 438–440.

6. 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.

7. 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. — Vol.474. — P. 107–110.

8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — Vol.15. — №3. — P. 473–497.

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.

Резюме

Начаты исследования по получению асептической культуры двух сортов *Olea europaea* L. селекции НБС-ННЦ. Разработаны способы стерилизации сегментов побега с применением 2,5%-ного раствора NaClO или 0,1%-ного раствора HgCl₂. Индуцирована регенерация *in vitro* микропобегов у сортов Никитская и Никитская Крупноплодная.

Розпочато дослідження з отримання асептичної культури двох сортів *Olea europaea* L. селекції НБС-ННЦ. Розроблено способи стерилізації сегментів пагону з використанням 2,5%-ого розчину NaClO або 0,1%-ого розчину HgCl₂. Індуковано регенерацію *in vitro* мікропагонів сортів Нікітська та Нікітська Крупноплодна.

The investigation of obtaining the aseptic culture in two *Olea europaea* L. cultivars, bred in NBG-NSC, has been started. The methods of shoot segments sterilisation with 2,5% NaClO or 0,1% HgCl₂ have been worked out. The *in vitro* regeneration of olea microshoots cvs. Nikitskaya and Nikitskaya Krupnoplodnaya has been induced.

ЧЕБИКОВ М.В.,¹ СЕРЖУК О.П.

¹Національний дендрологічний парк “Софіївка” НАН України, Україна, 20300, г. Умань, вул. Київська, 12а; e-mail: sofievka@ck.ukrtel.net

²Уманський Національний університет садівництва, Україна, 20305, г. Умань, п/о “Софіївка-5” ; e-mail: Serzhuk83@rambler.ru

РОЗМНОЖЕННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *CRATAEGUS* L. У КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

Однією з цінних малопоширених плодкових рослин є рід *Crateugus*. У садівництві враховуються не лише корисні харчові та лікувальні властивості, а й декоративні характеристики культури.