

УДК 634.662:581.3:581.143.6

## СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ ЗИЗИФУСА (*ZIZYPHUS JUJUBA* MILL.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

И.В.МИТРОФАНОВА, В.С.ШЕВЕЛУХА

(Кафедра биотехнологии)

**Получены соматические зародыши зизифуса (*Zizyphus jujuba* Mill.) из семян незрелых зародышей на модифицированной среде Мурасиге — Скуга. Изучено влияние генотипа, размера эксплантата и ауксинов на образование соматических зародышей через прямой эмбриогенез.**

Метод культуры тканей в настоящее время применяется при решении многих проблем современной биологии, способствует внедрению новых сортов и форм в производство. Стратегия развития и применения этого метода для улучшения субтропических и тропических плодовых культур была разработана Литцем [10]. У некоторых тропических и субтропических лесных и промышленных видов (*Carica stipulata*, *Coffea arabica*, *Cocos nucifera*, *Citrus* spp., *Musa*, *Mangifera indica*, *Feijoa sellowiana* [6, 13, 14]) была получена регенерация растений через соматический эмбриогенез, являющийся одним из способов

размножения растений *in vitro*. Тип эксплантата, стадия его развития и взаимодействие эксплантата и питательной среды служат основными параметрами, определяющими соматический эмбриогенез [2]. У большинства культур незиготические зародыши были получены из нуцеллуса, клетки которого уже готовы к адвентивному или соматическому эмбриогенезу. Соматические зародыши получены из молодых листьев (*Euphoria longan* [11], *Japanese persimmon* [7], из верхушечной меристемы (*Phoenix dactylifera* [15]), из семян зародыша (*Punica granatum* [8], *Syzygium* spp. [12] и *Zizyphus jujuba* [1]).

В такого рода исследованиях в основном применяется среда Мурасиге и Скуга (МС) с половинным набором макроэлементов. Синтетические ауксины (2,4-Д и НУК) добавляют в питательную среду каждый по отдельности или в комбинации с цитокининами (БАП, 2 ip, кинетин). Имеются сообщения о том, что необходимо субкультивирование проэмбрио со среды, содержащей ауксины, на среду без гормонов, чтобы нормально развивались все органы зародыша.

Зизифус (*Zizyphus jujuba* Mill.), известный также под названием унаби, ююба, китайский финик, — многолетняя древесная культура; ее плоды, богатые углеводами, белками, витаминами и микроэлементами, употребляются в свежем, сушеном, консервированном виде.

Прорастание семян зизифуса — весьма трудный процесс из-за очень твердой скорлупы (эндокарпия). Известно, что значительная доля семян крупноплодных сортов нежизнеспособна и требует устранения эндокарпия, чтобы сэкономить энергию семян в процессе их прорастания [1, 5]. В последние годы появились сообщения о размножении зизифуса в культуре *in vitro* [4, 9]. Китайскими учеными Чен и Куи в 1981 г. изучался процесс развития зародыша у сорта Ху в условиях *in vitro* [3].

В задачу нашей работы входило исследование влияния генотипа, размера эксплантанта и добавления в питательную среду МС ауксинов в разных концентрациях и сочетаниях.

## Методика

Работа проводилась в отделе биотехнологии Государственного Никитского ботанического сада (г.Ялта). С сортоучастка ГНБС были взяты плоды 3 сортов зизифуса: Я-цзао — мелкоплодного, Китайского 2А — среднеплодного, Та-ян-цзао — крупноплодного.

Для стерилизации их погружали в 95% этиловый спирт, затем обжигали над пламенем спиртовки и помещали в стерильную чашку Петри. Плоды очищали от мякоти, разрезали околоплодник и ближе к халазальному концу семени делали надрез. Из семян вычленили незрелые зародыши разной величины — менее 4, 4—6, 6—10 мм.

Изолированные семядоли помещали на модифицированную питательную среду МС с различными концентрациями (0,5, 1,0, 3,0 мг/л) и сочетанием ауксинов 2,4-Д и НУК.

В течение 2 мес зародыши субкультивировали через 3 нед на свежую питательную среду МС. Исследуемый материал находился в темноте (в термостате) и на свету (2000—3000 люкс) при 16-часовом фотопериоде и температуре 26°C. В каждом варианте опыте было по 10 эксплантантов, выращиваемых в лабораторных пробирках. Количество соматических зародышей фиксировали на 60-й день культивирования.

## Результаты

Использованный метод стерилизации оказался очень эффективным: выход эксплантантов, свободных от инфекции, составил 100%.

Жизнеспособность зародышей во многом определялась временем взятия эксплантанта. Так, у плодов, взятых в период полного окрашивания, процент жизнеспособных зародышей был низким, у взятых в начале окрашивания — большинство зародышей оказались жизнеспособными.

Образование соматических зародышей или каллуса зависело от

концентрации или сочетания ауксинов в питательной среде НУК. При добавлении в среду НУК отдельно или в сочетании с 2,4-Д образовывался каллус: в первом случае — рыхлый, светло-желтого цвета, а в последнем — более плотный и ярко-желтого цвета. Каллусогенез наблюдался у всех 3 сортов через 25—30 дней культивирования (табл. 1, 2, 3).

Т а б л и ц а 1

Процессы эмбрио- и каллусообразования у эксплантантов размером до 4 мм, относящихся к разным генотипам

Ауксин и его концентрация, мг/л	Эксплантанты с соматическими зародышами (n=10)	Эмбриогенез	Каллусогенез	Время появления, дни		Количество соматических зародышей на семяздоли зиготического зародыша, шт.
				соматических зародышей	каллуса	

*Сорт Китайский 2А*

2,4-Д:						
0,5	6	+	-	30	-	2—3
1,0	3	+	-	40	-	2
3,0	3	+	-	40	-	1—2
α-НУК:						
0,5	-	-	+	-	30	-
1,0	-	-	+	-	25	-
3,0	-	-	+	-	30	-
2,4-Д, 0,5 +α-НУК, 0,5	2	+	+	45	40	2

*Сорт Я-цзао*

2,4-Д:						
0,5	5	+	-	40	-	2
1,0	2	+	-	40	-	1—2
3,0	2	+	-	45	-	1—2
α-НУК:						
0,5	-	-	+	-	30	-
1,0	-	-	+	-	30	-
3,0	-	-	+	-	30	-
2,4-Д, 0,5 +α-НУК, 0,5	3	+	+	40	35	1—2

Ауксин и его концентрация, мг/л	Эксплантанты с соматическими зародышами (n=10)	Эмбриогенез	Каллусогенез	Время появления, дни		Количество соматических зародышей на семядоли зиготического зародыша, шт.
				соматических зародышей	каллуса	

*Сорт Та-ян-цзао*

2,4-Д:						
0,5	7	+	-	30	-	2—3
1,0	4	+	-	30	-	1—2
3,0	3	+	-	35	-	1—2
α-НУК:						
0,5	-	-	+	-	30	-
1,0	-	-	+	-	30	-
3,0	-	-	+	-	30	-
2,4-Д, 0,5 +α-НУК, 0,5	3	+	+	35	30	2

Т а б л и ц а 2

Процессы эмбрио- и каллусогенеза у эксплантантов размером 4—6 мм, относящихся к разным генотипам

Ауксин и его концентрация, мг/л	Эксплантанты с соматическими зародышами (n=10)	Эмбриогенез	Каллусогенез	Время появления, дни		Количество соматических зародышей на семядоли зиготического зародыша, шт.
				соматических зародышей	каллуса	

*Сорт Китайский 2А*

2,4-Д:						
0,5	10	+	-	30	-	5—18
1,0	10	+	-	30	-	8—10
3,0	5	+	-	40	-	1—3
α-НУК:						
0,5	-	-	+	-	30	-
1,0	-	-	+	-	30	-
3,0	-	-	+	-	35	-
2,4-Д, 0,5+ α-НУК, 0,5	5	+	+	30	30	3—5

*Сорт Я-цзао*

2,4-Д:						
0,5	10	+	-	35	-	6—7
1,0	8	+	-	35	-	2—4
3,0	5	+	-	45	-	1—2

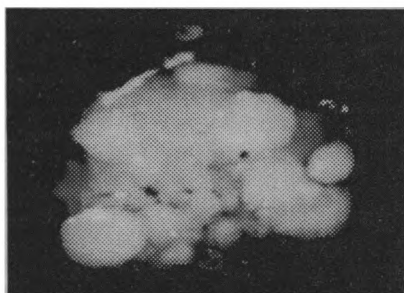
Ауксин и его концентрация, мг/л	Эксплантанты с соматическими зародышами (n=10)	Эмбриогенез	Каллусогенез	Время появления, дни		Количество соматических зародышей на семядоли зиготического зародыша, шт.
				соматических зародышей	каллуса	
<b>α-НУК:</b>						
0,5	-	-	+	-	30	-
1,0	-	-	+	-	30	-
3,0	-	-	+	-	35	-
2,4-Д, 0,5+ α-НУК, 0,5	8	+	+	45	25	2—4
<i>Сорт Та-ян-цзао</i>						
<b>2,4-Д:</b>						
0,5	10	+	-	30	-	2—3
1,0	5	+	-	30	-	2—3
3,0	3	+	-	30	-	1—2
<b>α-НУК:</b>						
0,5	-	-	+	-	30	-
1,0	-	-	+	-	30	-
3,0	-	-	+	-	35	-
2,4-Д, 0,5+ α-НУК, 0,5	5	+	+	35	30	1—2

Т а б л и ц а 3

**Процессы эмбрио- и каллусогенеза у эксплантантов размером 6—10 мм, относящихся к разным генотипам**

Ауксин и его концентрация, мг/л	Эксплантанты с соматическими зародышами (n=10)	Эмбриогенез	Каллусогенез	Время появления, дни		Количество соматических зародышей на семядоли зиготического зародыша, шт.
				соматических зародышей	каллуса	
<i>Сорт Китайский 2А</i>						
<b>2,4-Д:</b>						
0,5	10	+	-	30	-	5—15
1,0	10	+	-	30	-	6—10
3,0	5	+	-	40	-	1—3
<b>α-НУК:</b>						
0,5	-	-	+	-	30	-
1,0	-	-	+	-	30	-
3,0	-	-	+	-	30	-
2,4-Д, 0,5+ α-НУК, 0,5	4	+	+	35	30	2—6

Ауксин и его концентрация, мг/л	Эксплантанты с соматическими зародышами (n=10)	Эмбриогенез	Каллусогенез	Время появления, дни		Количество соматических зародышей на семядоли зиготического зародыша, шт.
				соматических зародышей	каллуса	
<i>Сорт Я-цзао</i>						
2,4-Д:						
0,5	10	+	-	35	-	5—8
1,0	6	+	-	40	-	2—4
3,0	4	+	-	40	-	1—2
α-НУК:						
0,5	-	-	+	-	25	-
1,0	-	-	+	-	30	-
3,0	-	-	+	-	25	-
2,4-Д, 0,5+ α-НУК, 0,5	9	+	+	30	40	2—3
<i>Сорт Та-ян-цзао</i>						
2,4-Д:						
0,5	9	+	-	30	-	2—3
1,0	5	+	-	30	-	2—3
3,0	4	+	-	35	-	1—2
α-НУК:						
0,5	-	-	+	-	30	-
1,0	-	-	+	-	25	-
3,0	-	-	+	-	30	-
2,4-Д, 0,5+ α-НУК, 0,5	5	+	+	30	30	1—2



Образование соматических зародышей зизифуса сорта Я-цзао.

Незиготические зародыши формировались на питательной среде МС с добавлением 2,4-Д в

концентрациях 0,5, 1,0, 3,0 мг/л. Когда эксплантант культивировали на питательной среде с НУК + 2,4-Д (0,5 + 0,5 мг/л), на его поверхности инициировался эмбриогенез и образовывался каллус. В целом интенсивность образования соматических зародышей на питательной среде МС при концентрациях 2,4-Д 1 и 3 мг/л и при сочетании 2,4-Д и НУК (0,5 + 0,5 мг/л) сравнительно невысока. На среде с 2,4-Д при концентрации 0,5 мг/л формировалось оптимальное количество незиготических зародышей.

Из табл. 1, 2 и 3 видно также, что количество образующихся соматических зародышей зависит от размера эксплантанта. Наибольшее количество незиготических зародышей образовывали эксплантанты размером 4—6 мм. У эксплантантов размерами менее 4 и 6—10 мм эта способность выражена в меньшей степени. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности введения в культуру *in vitro* семядолей размером 4—6 мм.

Генотип зизифуса играл также немаловажную роль в формировании соматических зародышей. На питательной среде МС с концентрацией 2,4-Д 0,5 мг/л у сорта Китайский 2А на одном эксплантанте сформировалось от 5 до 18 проэмбрио. Они плотно прилегали друг к другу, чаще всего были небольшого размера. У сортов Я-цзао и Та-ян-цзао соматические зародыши были достаточно крупные, но их количество не превышало 5—6 и 2—3 шт. соответственно (рисунок). Судя по литературным данным, корейским и китайским ученым не удалось получить соматические зародыши зизифуса [3, 4, 9].

Проведенный эксперимент показал, что можно получать проэмбрио из семядолей незрелых зародышей через прямой соматический эмбриогенез. Это позволит решить ряд проблем, связанных с размножением зизифуса, прежде всего гибридного материала и крупноплодных сортов. Соматические зародыши будут служить прекрасным источником для создания искусственных семян.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Митрофанова И.В., Синько Л.Т. Соматические зародыши зизифуса в культуре *in vitro*. — Тез. докл.: Новые методы биотехнологии растений/II Российский симпозиум. Пушино, 18—20 мая 1993 г. Пушино, 1993. — 2. *Amirato P.V.* Handbook of plant cell culture/Ed. D.A.Evans et al. — Macmillan: N.Y., 1983, vol.1, p.82—123. — 3. *Chen W.L., Qui D.H.* — Acta Phytophysiol. Sinica, 1981, vol. 7, № 1, p. 83—84. — 4. *Cheong S.T., Kim S.K., Paek K.Y., Ahn M.K.* — J. of the Korean Soc. for Horticultural Sci., 1987, vol. 28, № 1, p.53—60. — 5. *Cheong S.T., Kim J.S.* — J. of the Korean Soc. for Horticultural Sci., 1984, vol. 25, № 3, p.241—249. — 6. *Cruz Gil S., Canhoto Jorge M., Abreu M.A.V.* — Plant Sci., 1990, vol. 66, № 2, p. 263—270. — 7. *Fukui H., Nishimoto K., Murase I., Nakamura M.* — Japan J. Breedg., 1988, vol. 38, № 4, p.465—469. — 8. *Kanchan J., Mehra P.V.* — Canad.J. of Bot., 1986, vol. 64, № 8, p. 1644—1653. — 9. *Kim S.K., Hwang J.H., Paek K.Y., Han B.H., Hwang J.H.* — J. of the Korean Soc. for Hort. Sci., 1987, vol. 28, № 2, p. 131—136. — 10. *Litz R.E.* — Applications of Biotechnology in Forestry and Horticulture / Ed. V.Dhawan. — Plenum Publishing Corporation, 1989, p. 109—118. — 11. *Litz R.E.* — J.Plant Physiol., 1988, vol. 132, p. 190—194. — 12. *Litz R.E.* — Tissue Culture in Forestry and Agriculture / Ed. R.R.Henke et al. — N.Y.: Plenum, 1985, p. 179—193. — 13. *Litz R.E., Conover R.A.* — Hort. Sci., 1980, vol. 15,

p. 733—735. — 14. Litz R.E., Reynolds J.E., Murashige T. — In Knight R.J., Gazit S. — Sci., Hort., vitro, 1979, vol. 15, p. 383—387. 1984, vol. 22, p. 233—240. — 15. *Статья поступила 23 апреля 1994 г.*

#### SUMMARY

Somatic embryos of *Zizyphus jujuba* are produced from cotyledons of immature embryos on modified medium Murasige-Skuga. The effect of genotype, the size of explant and auxins on formation of somatic embryos by means of direct embryogenesis has been studied.