

УДК 633.63:631.52

ГОНТАРЕНКО С.М., кандидат біол. наук, с.н.с.,

ГЕРАСИМЕНКО Г.М., аспірант

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

АНДРОГЕННІ КАЛУСИ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

У статті наведений спосіб отримання андрогенних калусів цукрових буряків шляхом культивування пиляків в умовах *in vitro*. Розглянуті основні фактори, що впливають на процес індукції андрогенезу, зокрема склад живильних середовищ для культивування пиляків, проліферації калусу. Показано, що саме вміст та співвідношення регуляторів росту (ауксини – цитокініни) є визначальним для отримання калусів та стимуляції їх морфогенної активності.

Ключові слова: цукрові буряки, культура *in vitro*, пиляк, калус, андрогенез

Вступ. Створення нових сортів та гібридів цукрових буряків, однієї з найбільш важливих не тільки технічних, а й біоенергетичних культур України, методами традиційної селекції і класичної генетики є трудомістким процесом з величезними витратами часу. Одним із сучасних методів, що дозволяє створювати гібриди з високою продуктивністю та комплексом корисних ознак, є метод експериментального андрогенезу – отримання гаплоїдів у культурі пиляків та ізольованих мікроспор. Можливість створення в короткі терміни гомозиготних ліній при диплоїдизації гаплоїдних ліній робить цей метод надзвичайно привабливим для селекціонерів [1, 2, 4]. В умовах культури *in vitro* індукція утворення ембріодів може відбуватися двома шляхами: прямим – у культурі морфогенних мікроспор та непрямим шляхом – за рахунок утворення калусу й індукції утворення соматичних зародків. Останніми роками інтенсивно розробляють методи отримання гомозиготних подвоєних гаплоїдних ліній саме через культуру *in vitro* пиляків та формування ембріогенних калусів. А як відомо, генетичне різноманіття калусних клітин дозволяє використовувати їх також і для клітинної селекції на стійкість до несприятливих факторів середовища, фітопатогенів та підвищену продуктивність.

На даний час розроблені методи андрогенезу для отримання гаплоїдних рослин для багатьох культур, у тому числі – овочевих, плодових, зернових та інших [5, 6, 7, 8]. Разом із тим, у деяких видів рослин спроби отримання андрогенних гаплоїдів виявилися безуспішними. Саме до таких культур відносять цукрові буряки. Таким чином, розробка методів отримання гаплоїдних рослин цукрових буряків шляхом андрогенезу є актуальною.

У зв'язку із тим, що ключовим етапом непрямого андрогенезу є отримання морфогенних калусів, метою наших досліджень було розробити методи отримання калусів з пиляків цукрових буряків (основи методу непрямого андрогенезу) в культурі *in vitro*.

Матеріали та методика досліджень. Дослідження проводили в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН впродовж 2009-2013 років. У дослідженнях використовували селекційний матеріал Білоцерківської та Ялтушківської дослідно-селекційних станцій ІБКіЦБ – ди- і тетраплоїдні запилювачі цукрових буряків, які вирощували в умовах поля. У період цвітіння насінників відбирали пагони з бутонами, з яких отримували експланти – пиляки. Стебла з бутонами насінників цукрових буряків були піддані холодовій передобробці у холодильній камері за температури 6-10⁰С, при 16-годинному освітленні 1,0-2,0 клк упродовж 7-30 діб.

Для стерилізації експлантів цукрових буряків використовували гіпохлорит натрію і наступний режим: 25% розчин «Білизни» протягом 20-35 хвилин, потрійне промивання стерильною дистильованою водою, 3-10% розчин пероксиду водню протягом 10-20 хвилин.

У зв'язку із тим, що наші попередні дослідження показали, що відомі схеми та методи, розроблені для різних культур [2, 3, 4, 6, 7, 8], не можуть бути успішно застосовані в роботі з пиляками та пилком цукрових буряків, з метою отримання гаплоїдів у культурі *in vitro*, їх використовували тільки як основу для модифікації та оптимізації.

Так, для культивування пиляків було розроблено серію живильних середовищ. Добір та оптимізацію складу середовищ проводили за факторами: макроелементи, мікроелементи, фітогормони, вуглеводи, амінокислоти, вітаміни та інші домішки. За основу використовували мінеральну частину середовища Мурасіге-Скуга [12] з повною та зменшеною у 2 рази кількістю макроелементів, додаванням вітамінів згідно пропису Гамборга [10], аскорбінової кислоти – 1,0 мг/л, сахарози – 15-100 г/л та регуляторів росту: 2,4-Д – 1,0-2,0 мг/л, 6-БАП – 0,2-1,0 мг/л, кінетину – 2,0-3,0 мг/л, ІОК – 0,2-0,5 мг/л, НОК – 0,5-1,0 мг/л, ГК – 0,2-0,5 мг/л, а також суміші амінокислот, що включали глютамін – 12,5-500,0 мг/л, аспарагінову кислоту – 30,0-50,0 мг/л, аргінін – 2,0-250,0 мг/л, а також пролін, гідроксипролін, тирозин, гліцин у дозі 2,0-5,0 мг/л. У деяких середовищах використовували мальтозу замість сахарози.

Культивували пиляки після висаджування на живильні середовища в темряві за температури 26-32°C та відносній вологості повітря 50-70% до проліферації калусів. Утворені калуси переносили в умови культуральної кімнати з освітленням 1-2 клк протягом 18 годин і через певний проміжок часу (1-3 тижні) пересаджували на нову серію живильних середовищ, яка відрізнялась від попередньої вмістом і дозуванням регуляторів росту. Так, зокрема, в першій серії середовищ, яку використовували для проліферації калусів, вміст ауксинів був вищим за вміст цитокінінів (2,4-Д – 1-2,5 мг/л та БАП – 0,3-0,8 мг/л), у другій, призначеній для підтримки ростової функції калусів, навпаки – вміст цитокінінів був вищим за вміст ауксинів (6-БАП – 1,0 мг/л, або 2,0 мг/л, 5,0 мг/л, 2,4-Д – 0,2 мг/л), а в деяких середовищах ауксини були відсутні. У третій серії, яку використовували для стимуляції морфогенезу, вміст та співвідношення регуляторів росту іншим, а саме: 6-БАП – 1,0-5,0 мг/л, ІОК або НОК – 0,2-0,6 мг/л, ГК – 0,2-1,0 мг/л, кінетину – 0,1-1,0 мг/л. Калуси культивували на запропонованих середовищах для стимуляції органогенезу до появи первинних корінців та бруньок.

На різних етапах культивування калусів визначали їх кількість та різновиди. Калуси розрізняли: за консистенцією (пухка, напівтверда, тверда), забарвленням (білі, зелені, коричневі, жовті, різнокольорові), поверхневою структурою (гладка, зерниста, вузлова, бугорчата), вмістом хлорофілу (хлорофільні, безхлорофільні), структурою (гомогенна чи гетерогенна), наявністю меристематичних центрів, спроможністю до формування морфогенних меристем та органогенезу.

Результати дослідження. Як відомо, процес індукції андрогенезу в культурі ізолюваних пиляків залежить від багатьох взаємопов'язаних факторів, зокрема, це відбір і передобробка експлантів, складові елементи живильного середовища для культивування пиляків, мікроспор, індукції калусогенезу та режими культивування [2]. Проте ці фактори вузькоспецифічні не тільки для різних видів рослин, але й виду експлантів, і навіть для різних етапів культивування експлантів одного виду [13]. Тому були розроблені специфічні умови та методичні основи непрямого андрогенезу, які були цілеспрямовані на створення нового селекційного матеріалу у культурі ізолюваних пиляків та мікроспор саме цукрових буряків.

Загальновідомо, що одним з основних факторів, що впливає на індукцію андрогенезу в культурі *in vitro* є склад живильного середовища [10]. Тому особлива увага приділялася розробці живильних середовищ.

Встановлено, що утворення калусних тканин на пиляках цукрових буряків в умовах *in vitro* відбувається на модифікованому середовищі Мурасіге-Скуга, що містить зменшену у 2 рази дозу макроелементів та повну дозу мікроелементів, з додаванням регуляторів росту: 2,4-Д – 1,0-2,5 мг/л та БАП – 0,3-0,8 мг/л, вітамінів за Гамборгом і аскорбінової кислоти в дозі 1,0 мг/л, амінокислот: глютамінової – 250,0-500,0 мг/л, аспарагінової кислоти – 30,0-50,0 мг/л, тірозину – 1,0-10,0 мг/л, аргініну – 2,0-10,0 мг/л, гідроксипроліну – 2,0-4,0 мг/л. Подальший ріст калусів забезпечувало друге середовище – модифіковане середовище Мурасіге-Скуга, з додаванням БАП – 0,5-1,5 мг/л, вітамінів та амінокислот за схемою першого середовища, а появу первинних корінців та бруньок – третє середовище – модифіковане середовище Мурасіге-Скуга, з додаванням БАП – 1,0-5,0 мг/л, ІОК або НОК

0,2-0,6 мг/л, ГК – 0,2-1,0 мг/л, а вітамінів та амінокислот також за схемою першого середовища.

Для ініціації калусогенеза при культивуванні ізолюваних пиляків та отримання більшої кількості калусів, стимуляції морфогенеза подальшу модифікацію складу базових середовищ проводили за факторами: регулятори росту, вуглеводи, амінокислоти, вітаміни.

Відомо, що найбільш суттєве значення має підбір оптимальних концентрацій гормональних компонентів живильного середовища [9]. Встановлено, що саме вміст 2,4-Д (1-2,5 мг/л), як основного регулятора росту, за наявності 6-БАП (0,3-0,8 мг/л) у складі першої серії живильних середовищ, сприяє проліферації калусів при культивуванні пиляків цукрових буряків. Тоді, як збільшення вмісту цитокинінів у другій серії середовищ та корегування їх співвідношення з 2,4-Д таким чином, що їх вміст був вищим за вміст 2,4-Д, сприяло росту та розвитку калусів. Морфогенній активності калусів, отриманню великої кількості їх різновидів, стимуляції органогенезу, з появою первинних корінців та бруньок сприяли середовища третьої серії, з іншим вмістом та співвідношення регуляторів росту, а саме: 6-БАП – 1,0-5,0 мг/л, ІОК або НОК – 0,2-0,6 мг/л, ГК – 0,2-1,0 мг/л, кінетину – 0,1-1,0 мг/л.

З літературних джерел відомо, що збільшення в живильному середовищі кількості цукру при культивуванні недозрілих зародків цукрових буряків майже вдвічі збільшує частоту утворення проростків [11].

Згідно отриманих нами даних, при культивуванні пиляків цукрових буряків збільшення кількості цукру в середовищі суттєво не вплинуло на кількість новоутворень. Заміна сахарози мальтозою також не вплинула на кількість калусів, що утворилися, але сприяла значному збільшенню розмірів висаджених пиляків. Так, розмір пиляків на середовищі з мальтозою був майже в 2-2,5 рази більший від такого, який був при культивуванні пиляків на середовищі з сахарозою.

Спостереження показали, що перші новоутворення з'явилися через 6-7 діб від початку культивування (рис. 1, 2). Калуси розвивались із різних структур: з поверхні пиляка, з залишків тичинкової нитки за рахунок її видовження та розвитку ініціюючих калусні тканини структур на їх кінчиках, з пилку. Вони були переважно білого кольору або напівпрозорі і мали гомогенну структуру (рис. 3, 4).

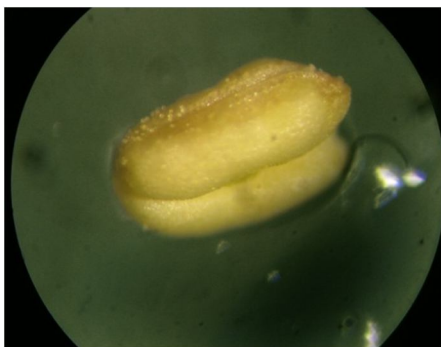


Рис. 1. Пиляк цукрових буряків *in vitro*

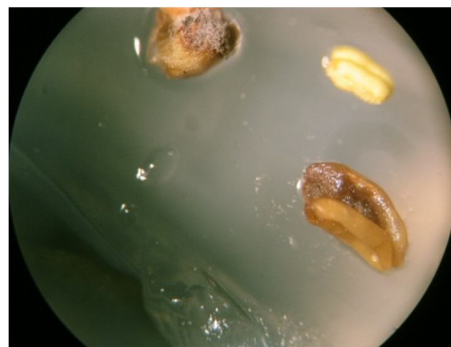


Рис. 2. Проліферація калусу

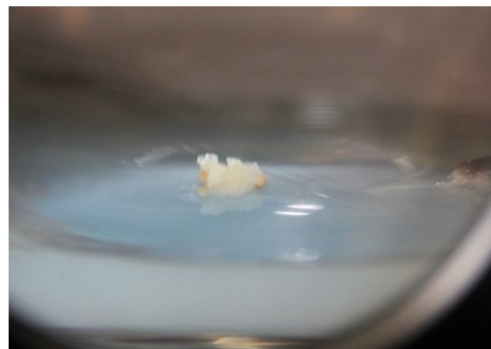


Рис. 3, 4. Різновиди первинного андрогенного калусу

Дослідження показали, що на різних етапах культивування калусів під впливом різних діючих речовин у складі живильних середовищ були отримані вторинні (рис. 5, 6) і третинні калуси (рис. 7, 8).

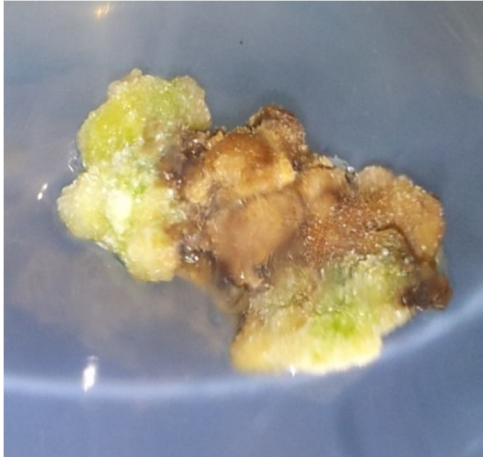


Рис. 5, 6. Різновиди вторинних андрогенних калусів

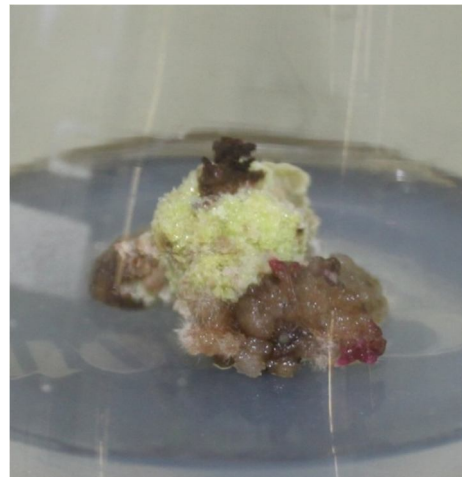
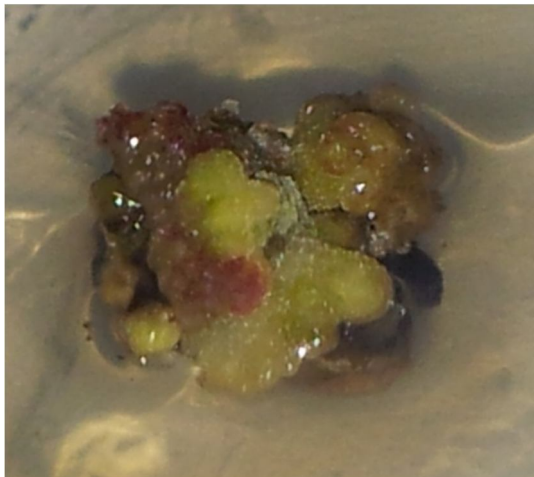


Рис. 7, 8. Різновиди третинних андрогенних калусів

Дифереціація калусів відбувалася не тільки за розміром, консистенцією – тверді, пухкі, напівтверді; кольором – білі, зелені, коричневі, різнокольорові; структурою тканин – гомогенні, гетерогенні; за структурою поверхні – бугорчата, зерниста, вузловата, гладка; в залежності від здатності до подальшого морфогенезу – морфогенні і неморфогенні. Морфогенні з зеленими меристематичними центрами, корінцями, паростками та розеткою листків (рис. 9, 10).

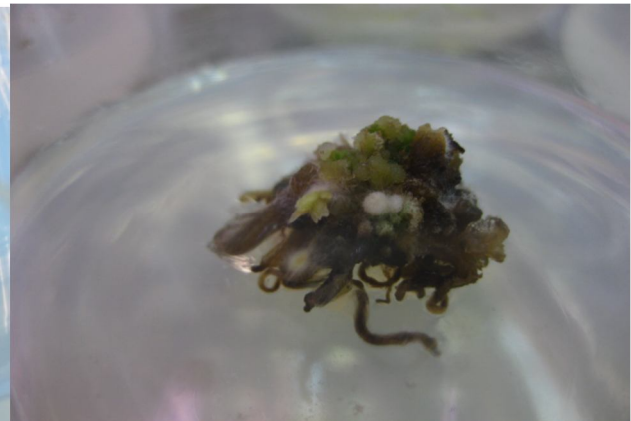
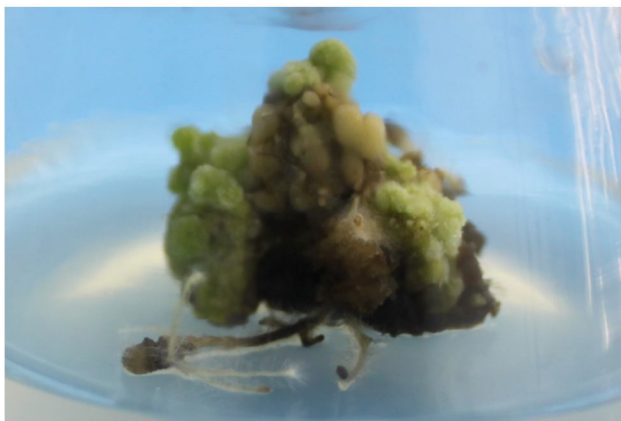


Рис. 9, 10. Різновиди третинного андрогенного калусу (морфогенні)

Висновки.

1. У результаті досліджень розроблено основні елементи методу непрямого андрогенезу цукрових буряків у культурі *in vitro*, зокрема, склад живильних середовищ для культивування пиляків, проліферації калусу, та отримання різних його модифікацій за кольором, структурою.
2. Встановлено, що саме вміст та співвідношення регуляторів росту (ауксини – цитокиніни) є визначальним для отримання калусів та стимуляції їх морфогенної активності.
3. У залежності від співвідношення регуляторів росту та інших складових живильних середовищ (амінокислоти, вітаміни, цукри та ін.) отримані калуси різнилися за кольором, вмістом хлорофілу, гомо- чи гетерогенністю структури, наявністю меристематичних центрів, спроможністю до формування морфогенних меристем та органогенезу.

Список використаних літературних джерел.

1. Атанасов А.И. Биотехнология в растениеводстве/ Атанасов А.И. – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1993. – 160 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений и биотехнологии на их основе / Бутенко Р.Г. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 159 с. – (Учеб. пособие).
3. Данвелл Д.М. Культура гаплоидных клеток / Д.М. Данвелл; пер. с англ. Р.Г. Бутенко // Биотехнология растений: культура клеток – М.: Агропромиздат, 1989. – С. 33-51.
4. Ницше В. Гаплоиды в селекции растений / В. Ницше, Г. Венцель; пер. с англ. В.В. Попова. – М.: Колос, 1980. – 128 с.
5. Муромцев Г.С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Р.Г. Бутенко, Т.И. Тихоненко, М.И. Прокофьев. – М.: Агропромиздат, 1990. – 384 с.
6. Сатарова Т.М. Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro* : дис. ... д-ра біол. наук: спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / Т.М. Сатарова ; НАН України, Ін-т клітин. біології та генет. інженерії. – К., 2002. – 537 с.
7. Белинская Е.В. Генотипические особенности индукции гаплоидов в культуре пыльников ячменя / Е.В. Белинская, Л.Н. Наумова, В.Т. Манзюк // Цитология и генетика. – 1993. – Т. 27, № 5. – С. 84-88.
8. Круглова Н.Н. Морфогенез андроклиных каллюсов злаков *in vitro* / Н.Н. Круглова, О.В. Дубровная // Физиология и биохимия культурных растений. – 2011. – № 1. – С. 15-25.
9. Полевой В.В. Фитогормоны / В.В. Полевой. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – 248 с.
10. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин : монографія / Г.П. Кушні, В.В. Сарнацька – К.: Наукова думка, 2005. – 270 с.
11. Подвигина О. А. Теоретическое обоснование и приемы использования методов биотехнологии в селекции сахарной свеклы : дис. ... д-ра с.-х. наук : 06.01.05 «Селекция и семеноводство» / О.А. Подвигина. – Воронеж, 2003. – 280 с.
12. Murashige T.A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – p. 473-497
13. Van Geyt J. Induction of haploids of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by means of androgenesis and gynogenesis / J. Van Geyt, M. Jacobs // *Bull. Soc. Bot. France. Act Bot.* – 1986. – V. 133, № 4. – P. 83.

Аннотація

Гонтаренко С.Н., Герасименко А.Н.

Андрогенные каллусы сахарной свеклы

В статье представлен способ получения андрогенных каллюсов сахарной свеклы при культивировании пыльников в условиях *in vitro*. Рассмотрены основные факторы, влияющие на процесс индукции андрогенеза, в частности состав питательных сред для культивирования пыльников, пролиферации каллюсов. Показано, что именно содержание и соотношение регуляторов роста (ауксины - цитокинины) является определяющим для получения каллуса и стимуляции их морфогенной активности.

Ключевые слова: сахарная свекла, культура *in vitro*, пыльник, каллус, андрогенез

Annotation

Gontarenko S., Gerasymenko A.
Androgenic callus of sugar beet

The article describes a way to obtain androgenic callus of sugar beet by culturing anthers in conditions in vitro. The basic factors that affect the process of induction of androgenic particular composition of culture media for culturing anthers, proliferation callus. It is shown that the content and growth regulators (auxin - cytokinins) is crucial to get callus and stimulate their morphogenic activity.

Keywords: *sugar beet, culture in vitro, anthers, callus, androgenesis*

Отримано редакцією – 17.03.2014 р.

УДК 632.5.01./08

ГУНЧАК В.М., кандидат с.-г. наук,

ШЕВАГА Г.М., молодший науковий співробітник,

КОРДУЛЯН Р.О., науковий співробітник,

Українська науково-дослідна станція карантину рослин ІЗР НААН України

КИРИК М.М., доктор біол. наук, академік НААН України,

Національний університет біотехнології і природокористування

e-mail: ukrndskr@gmail.com

**ЗАСТОСУВАННЯ БІОЛОГІЧНОГО РЕГУЛЯТОРА РОСТУ «REGLALG» У
КУЛЬТУРИ *IN VITRO* НА РОСЛИНАХ КАРТОПЛІ**

Досліджено ефективність застосування біологічного регулятора росту «Reglalg» у процесі клонального мікророзмноження оздоровлених рослин картоплі. Установлено, що норма 0,25-1 мг/л в культурі in vitro є оптимальною для регенерації живців, утворення нових листків (вузлів), формування повноцінної рослини. Визначено найнижчий рівень витоку електролітів, що пояснюється підвищенням стійкості картоплі до високої температури та опосередковано впливає на загальну стійкість до хвороб.

Ключові слова: *картопля, «Reglalg», клональне мікророзмноження, витік електролітів, рослини in vitro*

Вступ. В практиці підвищення продуктивності картоплі добре зарекомендувала себе технологія клонального мікророзмноження безвірусних рослин картоплі на основі культивування клональних мікророслин на живильних середовищах *in vitro*. Успішне вирощування рослин *in vitro* забезпечується, перш за все, правильним підбором живильного середовища, що відповідає фізіологічним особливостям культивованих рослин [1]. Мінеральний склад живильного середовища забезпечує збалансоване і достатнє живлення рослин картоплі необхідними поживними елементами [2]. Відомо, що всі компоненти живильного середовища можуть впливати на проходження процесу клонального мікророзмноження. Для культивування *in vitro* рослин використовують середовища, які різняться не тільки мінеральною основою, але й композицією живильних та біологічно активних речовин [3].

Останніми роками у світі поряд із хімічними методами захисту рослин для підвищення продуктивності останніх широкого застосування набув біологічний метод [4]. Зараз широко застосовують БАР (біологічно активні речовини), які забезпечують захист рослин від широкого спектру хвороб, підвищують стійкість рослин за екстремальних кліматичних умов шляхом створення сприятливих умов росту і розвитку рослин. БАР стимулюють розвиток і забезпечують високу продуктивність та якість урожаю [5]. У зв'язку із цим, у сільському господарстві застосовують біологічні засоби, які не є шкідливими. До таких препаратів відноситься «Reglalg».