

С.І. Кондратенко, кандидат біологічних наук,
Т.В. Чернишенко, кандидат сільськогосподарських наук,
Інститут овочівництва і баштанництва НААН,
П.Г. Дульнев, кандидат хімічних наук,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України

**ДІЯ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ, ПОХІДНИХ ПІРИДИНУ
НА ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОЇДІВ В КУЛЬТУРІ
МЕРИСТЕМАТИЧНИХ ТКАНИН КАПУСТИ ГОЛОВЧАСТОЇ *IN VITRO***

Опубліковано результати випробувань біологічно активних речовин, похідних піридину у біотехнологічних дослідженнях. За ступенем ефективності виділено препарати цитокінінової дії ДПР-77, ДПР-82, які індукували як органогенез, так і соматичний ембріогенез в культурі меристематичних тканин 4 сортів капусти головчастої in vitro.

Ключові слова: капуста головчаста, регулятори росту, клональне мікророзмноження *in vitro*, ембріогенез, цитокініни.

Вступ. Основним суттєвим фактором, який обмежує регенераційну здатність введених в культуру *in vitro* клітин меристеми є реакція генотипу рослин на застосовані гормональні компоненти живильних середовищ [1]. Тому для підвищення ефективності клонального мікророзмноження доцільно постійно проводити пошукові роботи з тестування нових біологічно активних речовин у культурі *in vitro*, які мають кращі регуляторні властивості на відміну від існуючих фітогормонів та їх синтетичних аналогів. Численними дослідженнями було доведено, що формування рослин-регенерантів з меристематичних тканин *in vitro* проходить під впливом регуляторів цитокінінової дії [2-5]. За таких умов можлива реалізація двох програм морфогенезу рослин – органогенезу та ембріогенезу [3].

Регенерація рослин шляхом органогенезу передбачає проходження декількох послідовних у часі стадій формоутворення: поява калюсних новоутворень з меристематичних клітин на первинних експлантах; індукція адвентивних пагонів з калюсу меристематичних

© Кондратенко С.І., Чернишенко Т.В., Дульнев П.Г., 2011.

клітин; укорінення сформованих адвентивних пагонів, яким завершується формування повноцінних для подальшого дорощування *in vivo* пробіркових рослини-регенерантів.

Клональне мікророзмноження сільськогосподарських видів рослин, в якому регенерація рослин відбувається шляхом органогенезу, потребує, додатково циклу пересадки пробіркового матеріалу, пов'язаного з відокремленням адвентивних пагонів від вихідного експланту та їх переносом на живильне середовище для укорінення зі вмістом ауксинів. Формування фізіологічних полюсів, апікального і базипетального, у проембріональних новоутвореннях проходить одночасно, тому за один цикл культивування вихідних експлантів меристематичних тканин може створюватися повноцінна пробіркова рослина, яка вже не потребуватиме додаткового етапу дорощування на живильному середовищі для формування коренів [3].

Мета. Виходячи з вищевказаної проблематики, метою наших досліджень є пошук хімічних сполук, що мають цитокінінову дію, і які здатні підвищити ефективність біотехнології клонального мікророзмноження овочевих видів рослин за рахунок кращої реалізації генетичного потенціалу меристематичних клітин щодо формування рослин-регенерантів *in vitro*.

Методика досліджень. У 2009 році в лабораторії біотехнології Інституту овочівництва і баштанництва НААН проводили дослідження регуляторів росту, які за своєю хімічною структурою є похідними піридину. Цей клас сполук ми раніше вивчали в культурі протопластів і меристематичних тканин *in vitro* капусти білоголової [6, 7]. У дослідженнях, що висвітлено у даній публікації, використовували нові модифікації раніше синтезованих речовин (11 препаратів).

Як об'єкти досліджень ми відібрали три пізньостиглі сорти капусти білоголової Українська осінь, Харківська зимова і Ярославна і 1 сорт капусти червоноголової Палета селекції ІОБ НААН. Раніше було встановлено, що ці сортові генотипи капусти при культивуванні експлантів гіпокотилів ювенільних пробіркових рослин на агаризованому живильному середовищі Мурасіге і Скуга [8] у присутності екзогенних цитокінінів (зеатину, БАП, кінетину) формували адвентивні пагони.

Для приготування рослинного матеріалу насіння вищевказаних сортів капусти поверхнево стерилізували в асептичних умовах послідовним зануренням спочатку у 70 % розчин етанолу (1хв.), а потім у водний розчин побутового відбілювача "Білизна" (10 хв.), що вміщував 0,1 % Tween 20. Далі насіння тричі відмивали у стерильній дисти-

льованій воді протягом 10-20 хв. та висаджували на безгормональному середовищі МС і розміщували у темряві для пророщування при 25 °С. Протягом 7-9 діб культивування пророщене насіння формувало стерильні рослини з надмірно подовженими етіологованими гіпокотиліями. Одержані гіпокотилі з пророщеної розсади розрізали на сегменти довжиною 5-7 мм і висаджували на середовище МС, доповненні аналізованими речовинами. Для одного варіанту досліду 10 експлантів гіпокотилів одного сорту капусти розміщували на одну чашку Петрі з живильним середовищем. Культивування експлантів проводили в умовах 16-годинного фотоперіоду на розсіяному світлі з низькою інтенсивністю (500 люкс) і при постійній температурі 25 °С.

Фенологічні спостереження за розвитком культури проводились щодобово, а підрахунок кількості сформованих адвентивних пагонів після 2-х місяців культивування. Для вивчення регенераційних властивостей кожен аналізований препарат випробували у концентрації 3 мг/л. Як контроль використовували цитокініновий регулятор бензиламінопурин (БАП). При проведенні випробувань використовувався показник формування вегетативного потомства – коефіцієнт розмноження (КР), який розраховували як кількість утворених адвентивних пагонів та ембріоїдів на один культивований експлант гіпокотилів.

Результати досліджень. Цитокінінову дію препаратів вивчали на тканинному рівні з використанням культури експлантів гіпокотилів капусти головчастої *in vitro*. Як було доведено у попередніх дослідженнях цей вид рослинної тканини вміщує у своїй структурі клітини латеральної меристеми, з якої під впливом як природного (зеатин), так і синтетичних цитокінінів (БАП, кінетин) формуються адвентивні пагони [7].

Результати досліду на присутність цитокінінового ефекту у випробуваних біологічно активних речовин зведені в таблицю 1. Як свідчать отримані дані, регенерацію рослин спостерігали на середовищі МС, яке містило еталонний регулятор БАП та наступні синтетичні аналоги цитокініну: ДПР-77, ДПР-82, Д-01, Д-02, Д-1 та Д-2.

Дія випробуваних речовин мала наступні особливості. Для всіх відібраних сортів препарати ДПР-77, ДПР-82, Д-01, Д-02, Д-1 і Д-2 виявили цитокініновий ефект в індукції адвентивних пагонів. У таблиці 1 жирним шрифтом виділено значення показника КР для тих біологічно активних речовин, які індукували формування *de novo* меристематичних клонів у культурі експлантів гіпокотилів капусти головчастої як на рівні цитокініну БАП, так і з позитивною тенденцією щодо зростання показника КР у межах похибки контрольно-

го дослідю. Зокрема, препарати ДПР-77, ДПР-82 та Д-01 при застосуванні у випробуваній концентрації 3 мг/л на середовищі МС стимулювали утворення адвентивних пагонів на рівні дії регулятору БАП (показник КР варіював у межах 4,05-5,63). При цьому препарат ДПР-82 виявив статистично достовірно більшу ефективність щодо формування вегетативного потомства, ніж регулятор БАП (перевищення в 1,37 рази показника КР) в культурі експлантів гіпокотилів сорту капусти білоголової Українська осінь.

У досліді виявлено одночасний ефект формування рослин-регенерантів з меристематичного калюсу не тільки шляхом органогенезу (первинне формування адвентивних пагонів), але й соматичного ембріогенезу індукованого дією препаратів ДПР-77 та ДПР-82 (дані табл. 1). Найбільш ефективним індуктором ембріогенезу виявився препарат ДПР-82, за умов застосування якого з різною частотою утворення відбувалося формування соматичних ембріодів з меристематичного калюсу в культурі експлантів гіпокотилів усіх задіяних у досліді сортів капусти головчастої. За нашими спостереженнями ембріональні новоутворення формувалися та торцевих калюсних тканинах експлантів гіпокотилів, які зонально на ювенільних рослинках капусти були розташовані під черешками котиледонів. Зі сформованих соматичних ембріодів формувалися рослини-регенеранти, морфологічною особливістю яких була наявність утворених *de novo* котиледонів, апексів та коренів. З експлантів гіпокотилів, які були відокремлені від зон стебла, розташованих ближче до коренів, формувалися виключно адвентивні пагони.

За умов використання двох препаратів ДПР-77 і ДПР-82 за своїм ембріогенним потенціалом сорти капусти головчастої розподілено наступним чином: Харківська зимова (9 зразків, частота утворення – 0,45), Українська осінь (7 зразків, частота утворення – 0,35), Ярославна (6 зразків, частота утворення – 0,3) і Палета (2 зразки, частота утворення – 0,1). Враховуючи одержані дані для біотехнологічних досліджень, перспективними слід визнати препарати ДПР-77, ДПР-82 та Д-01.

Висновки. У дослідженнях з клонального мікророзмноження капусти головчастої проаналізовано на присутність цитокінінового ефекту 11 раніше ще не досліджених біологічно активних сполук, похідних піридину. За ступенем ефективності виділено 3 перспективних препарати ДПР-77, ДПР-82 та Д-01, серед яких перші два індукували як органогенез, так і соматичний ембріогенез у культурі експлантів гіпокотилів чотирьох сортів капусти головчастої *in vitro*.

1. – Результати випробувань біологічно активних речовин в культурі експлантів гіпокотилів сортів капусти головчастої *in vitro*

Назва препарату	Коефіцієнт розмноження (КР):	Кількість новоутворень	
		адвентивні пагони (зразки)	соматичні ембріюїди (зразки)
<i>сорт Українська осінь</i>			
БАП (контроль)	4,12	41	0
ДПР-77	4,05	38	2
ДПР-82	5,63	51	5
Д-01	4,21	42	0
Д-02	3,72	37	0
Д-1	3,51	35	0
Д-2	3,84	38	0
НІР _{0,05}	0,99	-	-
<i>Сорт Харківська зимова</i>			
БАП (контроль)	4,14	40	0
ДПР-77	3,42	29	5
ДПР-82	4,81	44	4
Д-01	4,22	42	0
Д-02	3,69	37	0
Д-1	3,38	34	0
Д-2	3,59	36	0
НІР _{0,05}	0,56	-	-
<i>сорт Ярославна</i>			
БАП (контроль)	4,72	47	0
ДПР-77	3,91	39	0
ДПР-82	5,33	47	6
Д-01	4,38	44	0
Д-02	3,52	35	0
Д-1	3,77	38	0
Д-2	3,61	36	0
НІР _{0,05}	1,03	-	-
<i>сорт Палета</i>			
БАП (контроль)	5,05	51	0
ДПР-77	3,78	38	0
ДПР-82	4,85	47	2
Д-01	4,82	48	0
Д-02	3,75	37	0
Д-1	3,53	35	0
Д-2	3,79	38	0
НІР _{0,05}	0,61	-	-

Бібліографія

1. Муромцев Г. С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев, Р. Г. Бутенко, Т. И. Тихоненко – М. : Агропромиздат. – 1990. – 384 с.
2. Биотехнология растений: культура клеток / [научн. ред. Бутенко Р. Г.]. – М. : Агропромиздат. – 1989. – 280 с.
3. Моисеева Н. А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений / Н. А. Моисеева // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М. : Наука, 1992 – С. 166-185.
4. Способ размножения растений. Патент на изобретение. Россия. МКИ 5 А01Н4/00 / С. А. Корнацкий, В. А. Высоцкий, В. Г. Трущечкин – № 2013946; Заявл. 06.08.1990; Оpubл. 15.06.1994. – 1994. – Бюл. № 11.
5. Способ выращивания растительных культур *in vitro* и питательная среда для его осуществления. Патент на изобретение. Россия. МКИ 6 А01Н4/00 / В. А. Высоцкий – № 2063681; Заявл. 01.10.1992; Оpubл. 20.07.1996. – 1996, Бюл. № 20.
6. Кондратенко С. И. Моделирование морфогенетических процессов с использованием новых подходов гормональной и осмотической регуляции в культуре протопластов высших растений / Кондратенко С. И. // Вісник проблем біології і медицини. – Полтава: УАННП, УМСА. – 2002. – Вип. 6. – С. 26-35.
7. Похідні N-оксиду піридину, що мають цитокінінову активність, та спосіб їх одержання. Патент на корисну модель. Україна. МПК 7, C07D213/89, A01N43/24 / С. І. Кондратенко, П. Г. Дульнев, Т. В. Чернышенко, В. А. Сидоров, О. М. Білогубова – № 65526; Заявл. 13.02.98; Оpubл. 15.04.2004. – 2004, Бюл. № 4. – 3.138 с.
8. Murashige T., Skoog F. A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V.15. – P. 473-497.

С.И. Кондратенко, Т.В. Чернышенко, П.Г. Дульнев. Действие регуляторов роста, производных пиридина на формирование эмбриоидов в культуре меристематических тканей капусты головчатой *in vitro*

Резюме. Опубликованы результаты испытаний биологически активных веществ, производных пиридина в биотехнологических исследованиях. По степени эффективности выделены препараты цитокининового действия ДПР-77, ДПР-82, которые индуцировало как органогенез, так и соматический эмбриогенез в культуре меристематических тканей 4 сортов капусты кочанной *in vitro*.

S.I. Kondratenko, T.V. Chernyshenko, P.G. Dulnev. "Influence of the growth regulators, pyridine derivatives on the formation of embryos in the culture of meristematic tissues of headed cabbage *in vitro*."

Summary. The test results of biologically active substances, pyridine derivatives in biotechnological investigations have been published. According to the degree of effectiveness the preparations of cytokinin action DPK-77, DPK-82 were picked out, which induced both organogenesis and somatic embryogenesis in the culture of meristematic tissues of 4 headed cabbage varieties *in vitro*.