

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв оборони, 15, e-mail: varya.krat@gmail.com

² Всеукраїнський науковий інститут селекції, Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 30

³ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

✉ varya.krat@gmail.com, (066) 574-61-04

ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ РОСТУ КАЛЮСУ МОРКВИ (*DAUCUS CAROTA* L. ogr g1531)

В основі культивування рослинних клітин *in vitro* лежить властивість тотипотентності, завдяки якій соматичні клітини рослини здатні повністю реалізувати спадкову інформацію і забезпечити розвиток всієї рослини [11]. Основним типом культивованої рослинної тканини є калюс – дедиференційована тканина, яка виникає внаслідок втрати специфічної властивості вихідної тканини органів рослини [8].

Утворення і ріст калюсної тканини контролюється регуляторами росту типу ауксинів і цитокінінів. Під дією ауксинів відбувається дедиференціювання, а під впливом цитокінінів – інтенсивний поділ клітин, у результаті якого утворюються тканини. Інтенсивність росту калюсу одного виду може варіювати залежно від кількості та складу гормональної композиції в живильному середовищі [8–10].

Культура калюсних тканин широко використовується в клітинній інженерії для створення нових форм рослин [10]. При цьому дуже важлива висока інтенсивність наростання калюсу та здатність клітин до регенерації. Ми використали калюсну культуру моркви завдяки її високій регенераційній здатності. Оскільки ріст калюсних культур видо- та генотип-специфічний, то для подальшої роботи з гібридом ogr g 1531 необхідно дослідити його за інтенсивністю наростання калюсу.

Матеріали і методи

Як вихідний матеріал у роботі було використано гібрид моркви *Daucus carota* L. ogr g1531 (Rijk Zwaan Breeding, Нідерланди). Поверхневу стерилізацію насіння проводили у 70 % етилового спирті (2 хв) та 30 % розчині гіпохлориту натрію (25 хв), після чого тричі промивали його в

дистильованій воді. Пророщували моркву на живильному середовищі МС [5].

Для ініціації росту калюсу гіпокотилі з 14-денних проростків висаджували на середовище В5 [2] з двома гормональними композиціями: 1) нафтилоцтова кислота (НОК) 1 мг/л + бензиламінопурин (БАП) 0,5 мг/л [3]; 2) дихлорофеноксицтова кислота (2,4-Д) 0,2 мг/л [6]. Наростання калюсу відбувалося при 25°C та 16ти годинному фотоперіоді. Через 30 діб після утворення калюсу на гіпокотилі проводили пасаж та робили оцінку інтенсивності наростання калюсу.

Інтенсивність наростання калюсу визначали за приростом маси шляхом зважування на початку та в кінці пасажу (10 діб). Для кожного наступного пасажу відбиралося по 4 г калюсу на 1 чашку Петрі.

Результати та обговорення

Для успішної ініціації калюсогенезу необхідний ретельний підбір гормональної композиції в живильному середовищі. З цього приводу проведено чимало досліджень. Одні дослідники використовують у якості індукторів калюсоутворення лише ауксини. Так, для ініціації росту калюсу моркви застосовували 2,4-Д у концентрації 1 мг/л [1], 0,2 мг/л [6], 0,1 мг/л [4]. В інших роботах описано утворення та ріст калюсної тканини за присутності ауксинів і цитокінінів, проте їхні співвідношення досить різняться, наприклад: БАП – 1 мг/л, 2,4-Д – 0,5 мг/л [7] або БАП 0,5 мг/л, НОК 1 мг/л [3]. У наших дослідженнях використані живильні середовища з двома композиціями гормонів: в одній присутні лише ауксини, інша складається як з ауксинів, так і з цитокінінів.

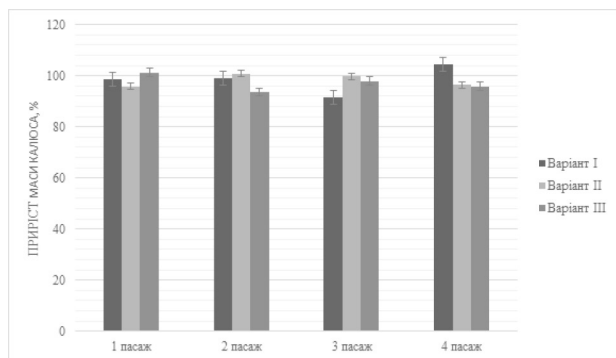


Рис. 1. Інтенсивність наростання калюсу на живильному середовищі B5 НОК 1 мг/л, БАП 0,5 мг/л

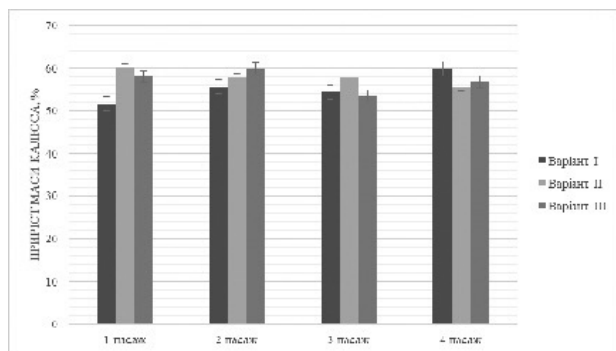


Рис. 2. Інтенсивність наростання калюсу в середовищі B5 з фітогормоном 2,4-Д 0,2 мг/л

За культивування калюсу на живильному середовищі, де присутні і ауксини, і цитокініни (НОК 1 мг/л, БАП 0,5 мг/л) (рис. 1), в середньому, отримано за 1-й пасаж 98,6 % приросту маси калюсу, за 2-й – 97,8 %, за 3-й – 96,3 % і за 4-й – 98,7 %. Отримані з різних пасажів результати істотно не відрізняються між собою. Під час дослідження інтенсивності наростання калюсної тканини на цьому живильному середовищі найвищий приріст маси становив 101,3 %, а найнижчий – 91,4 %.

Також було досліджено інтенсивність наростання калюсу моркви на живильному середовищі у присутності лише ауксинів (2,4-Д 0,2 мг/л) (рис. 2). Середній приріст маси калюсу моркви становив за 1-й пасаж 56,6 %, за 2-й – 57,8 %, за 3-й – 55,2 % і за 4-й – 57,4 %. Опираючись на

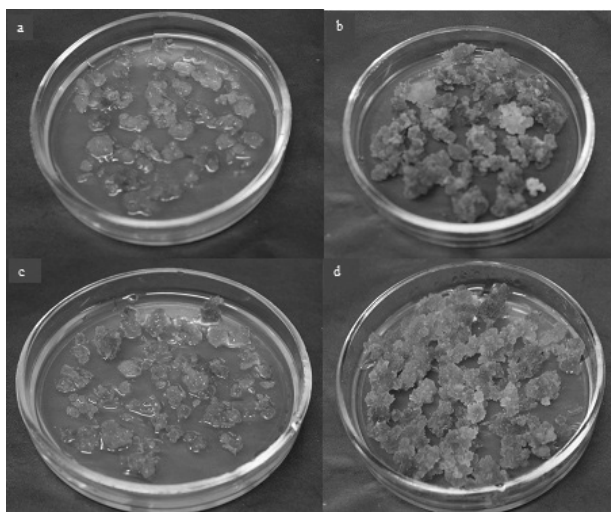


Рис. 3. Інтенсивність наростання калюсної тканини моркви: а, в – на середовищі з 2,4-Д 0,2 мг/л, на початку та в кінці пасажу; с, d – на середовищі з НОК 1 мг/л, БАП 0,5 мг/л

отримані результати, можна зробити висновок про їх невисоку розбіжність: 51,6 % – найменший приріст маси калюсу на цьому середовищі, 60,1 % – найвищий.

Таким чином, для отримання високої інтенсивності наростання маси калюсу моркви більш ефективним було живильне середовище, де з регуляторів росту присутні як ауксини, так і цитокініни (рис. 3). На такому середовищі за 10 діб можна подвоїти початкову масу калюсу. Присутність лише ауксинів менш ефективна для отримання високого приросту маси калюсної тканини. За один пасаж (10 діб) в середньому було отримано 57 %-й приріст калюсу.

Висновки

Для швидкого росту калюсної тканини моркви ефективною є присутність в живильному середовищі ауксинів і цитокінінів, а саме НОК 1 мг/л та БАП 0,5 мг/л. Така гормональна композиція дозволяє отримати приріст маси калюсу майже вдвічі більший порівняно з середовищем із додаванням лише ауксину 2,4-Д у кількості 0,2 мг/л.

ЛІТЕРАТУРА

1. Fileka M., Holdaa M., Macha I., Krekuleb J. The effect of electric field on callus induction with rape hypocotyls // *Z. Naturforsch.* – 2005. – 60. – P. 876–882.
2. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp Cell Res.* – 1968. – № 50. – P. 151–158.
3. Ghosh S., Sen J., Kalia S., Guha-Mukherjee S. Establishment of synchronization in carrot cell suspension culture and studies on stage specific activation of glyoxalase I // *Method in Cell Science.* – 1999. – № 21. – P. 141–148.
4. Grambow H.J., Kao K.N., Miller R.A., Gamborg O.L. Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension culture // *Planta.* – 1972. – 103. – P. 348–355.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant.* – 1962. – 15, N 3. – P. 473–497.
6. Rabiei K., Polyakov A., Khodambashi M., Sharafova O., Kalashnikova E., Hooshmand S., Omidi M. Carrot (*Daucus carota* L.) *in vitro* regeneration // *Vegetable Crops Research Bulletin* 73. – 2010. – № 73. – P. 13–22.
7. Vıctor M., Jime'nez, Fritz Bangerth Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot // *Physiologia Plantarum.* – 2001. – 111. – P. 389–395.
8. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 270 с.
9. Джейпер Дж., Скотт Р., Армитидж Ф., Уолден Р. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 108 с.
10. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с.
11. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 2009. – 41, N 6. – С. 496–508.

KRAT V.YU.¹, SYDOROV A.V.¹, GALYCHENKO S.V.³, PARIY YA.F.², SYMONENKO YU.V.³, PARIY M.F.^{1,2}

¹ National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

Ukraine, 03041, Kyiv, Heroiv Oborony str., 15, e-mail: varya.krat@gmail.com

² Ukrainian Science Institute of Plant Breeding

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasilkivska str., 30

³ Institute of Cell Biology and Genetic Ingeneering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine

Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148

GROWTH REGULATORS` EFFECT ON CARROT (*DAUCUS CAROTA* L. ogr g1531) CALLUS GROWTH

Aim. Callus tissues culture is widely used in cell engineering to create new forms of plants. High intensity of growth, controlled by growth regulators and regenerative ability of callus, is important for ease of research. *Daucus carota* L. – is a classic object of biotechnology due to its high regenerative capacity **Methods.** Increase of the callus growth intensity is determined by its weighing at the beginning and at the end of the passage. Results were counted as a percentage of the callus weight at the begining of the passage. **Results.** Callus weight increase on medium that contained both auxins and cytokinins were 98 %. And it was only 60 % increase on medium that contained only auxins. **Conclusions.** Both auxins and cytokinins are required for high efficiency of carrot (*D. carota*) callus growth increase.

Keywords: callus, *Daucus carota* L., callus growth increase, hormones.