

КОВБАСЕНКО Р. В.<sup>1✉</sup>, ДМИТРІЄВ О. П.<sup>1</sup>, ОЛІЙНИК Т. М.<sup>2</sup><sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: rayasenko@ukr.net<sup>2</sup> Інститут картоплярства НААН України,

Україна, 07853, Київська обл., Бородянський р-н, смт Немішаєве, вул. Чкалова, 22, e-mail: oliyunik@gmail.com

✉ rayasenko@ukr.net

## ЗАСТОСУВАННЯ АУКСИНО-ЦИТОКІНІНОВОГО ЗАМІННИКА В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* ПАСЛЬОНОВИХ КУЛЬТУР

**Мета.** Метою наших досліджень було встановлення можливості ініціації калусної культури рослин картоплі і томату з використанням промислових регуляторів росту, які дозволені для використання в Україні, до складу яких входять речовини з яскраво вираженою ауксин-цитокініною активністю. **Методи.** У роботі використовували сорти томату *Хорів* і *Борівський* та сорти картоплі *Божедар* і *Повінь*. Роботу з культурами в культурі *in vitro* проводили згідно із загальноприйнятими методиками. **Результати.** Створено замітник фітогормонів у відомому живильному агаризованому середовищі за прописом Мурасиге-Скуга. Для вирощування рослин томату і картоплі *in vitro* фітогормони замінено на розчини Екостиму та Екостиму 1, які виявили ауксин-цитокінінову активність. Вартість цих заміників значно нижча від ціни комерційних фітогормонів. **Висновки.** З'ясовано, що оптимальними для росту калусної культури пасльонових рослин та морфогенезу є варіанти із застосуванням цитокінінових заміників Екостим та Екостим 1 із нормою витрати відповідно 35,0 і 40,0 мг/л.

**Ключові слова:** модифікація МС-середовища, картопля, томати, культура клітин *in vitro*.

Мікроклональне розмноження культури томату через калусогенез дає унікальну можливість широко використовувати різноманітні селективні чинники для індукції соматоклональної варіабельності, що значно прискорює відбір та розмноження нових ліній із бажаними ознаками. Крім того, це дає унікальну можливість для підвищення генетичної однорідності та зростання продуктивності рослин, а також їх звільнення від патогенної інфекції та одержання у досить стислі терміни достатньої кількості посадкового матеріалу, особливо у зимовий період, для пот-

реб закритого ґрунту. При цьому також вирішується завдання тривалого зберігання рослин без контакту із зовнішнім середовищем та унеможливлення ураження їх карантинними об'єктами. Численними дослідженнями встановлено, що генотип рослини у значній мірі впливає на морфогенетичний потенціал експлантів *in vitro*. Генетичне різноманіття калусних тканин дозволяє використовувати їх для клітинної селекції на стійкість проти несприятливих факторів навколишнього середовища, фітопатогенів і на підвищену продуктивність [1]. Також загальновідомо, що для кожного нового сорту культурних рослин потрібен індивідуальний підбір композицій живильних середовищ, регуляторів росту та оптимізації технології культивування.

Для індукції калусогенезу до складу живильних середовищ обов'язково повинні входити ауксини, які викликають клітинну диференціацію, формування коренів та цитокініни, що індують ділення диференційованих клітин. Цитокініни у поєднанні з ауксинами активують ділення клітин та стимулюють розвиток стебел [2, 3]. Враховуючи досить високі ринкові ціни на ці регулятори росту, що застосовуються під час роботи у культурі *in vitro*, та із метою суттєвого здешевлення технології калусогенезу і мікроклонального розмноження вивчалися промислові регулятори росту. У якості заміника фітогормонів у МС-середовищі [4] ми використовували біогенні препарати Екостим (діюча речовина – водно-спиртовий розчин метаболітів штаму симбіотичного гриба-ендофіта *Panax Ginseng M*, виділеного із коренів женьшеню 650 мг/л) та Екостим-1 (діюча речовина – водно-спиртовий розчин метаболітів штаму симбіотичного гриба-ендофіта *Cylindrocarpon Destructans*, виділеного із коренів обліпихи – не менше 2000 мг/л), дозволені до використання в Україні [5], до складу яких входять речовини із яскраво

вираженою ауксину-цитокініновою активністю.

Метою проведених досліджень було встановлення можливості ініціації калюсної культури рослин картоплі і томату із використанням не традиційних регуляторів росту.

### Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були сорти томату *Хорів* і *Борівський* та сорти картоплі *Божедар* і *Повінь*. Роботу із рослинами в культурі *in vitro* проводили згідно із загальноприйнятими методиками [6, 7]. Для цього на агаризованому живильному середовищі первинні експланти із розрізаних на сегменти пластинок листків культивували за 24–26°C, освітлення 1,5–3,0 клк, фотоперіоду 16 год і відносної вологості 70 %. За 5–7 діб на експлантах починає утворюватися калюс. Мінеральна основа живильного середовища відповідала пропису МС [4]. Оцінка індексу росту проводилася на базі визначення приросту сирої маси калюсних культур. Під час перенесення калюсу на морфогенне середовище інтенсивність освітлення збільшували до 5–10 клк. Укорінення пагонів відбувалося без регуляторів росту із пониженим вмістом до 1 % цукрози. Добре сформовані рослини-регенеранти із 2–3 парами листків і розвинутою кореневою системою пересаджували у субстрат вермикуліту та після їх приживання пересаджували у теплицю. Водночас цим у теплицю висаджувалися рослини цих же сортів, одержані із насіння та вирощені за класичною технологією.

### Результати та обговорення

Першим етапом майже усіх клітинних технологій є одержання та підбір умов для культивування калюсних культур. Досить важливим фактором за ініціації та підтримання калюсогенезу є наявність у середовищі для інкубування фітогормонів, що відносяться до ауксинів та цитокінінів. Загальновідомо, що основними стимуляторами ділення рослинних клітин є цитокініни, однак додавання до живильного середовища ауксинів, особливо синтетичних, значно стимулює цей процес. При цьому механізми дії ауксинів та цитокінінів на цей процес досить відрізняються. Відомо: якщо концентрації ауксинів та цитокінінів у живильному середовищі відносно однакові або концентрація ауксинів дещо перевищує концентрацію цитокінінів, то стимулюється процес калюсогенезу [8-11]. Концентрація та співвідношення цих регуляторів росту у середовищі культивування, як правило, є сортоспецифічними та підбираються відповідно із типом експланта та мети культивування.

У своїй серії експериментів для стимуляції калюсогенезу томату в МС-середовище замість цитокініну та ауксину додавали замітники – розчини Екоциму та Екоциму 1 у різних концентраціях (табл. 1 і 3). Такі ж концентрації ауксин-цитокінінового замітника (АЦЗ) додавали до МС-середовища для стимуляції морфогенезу рослин томату (табл. 2 і 4).

Таблиця 1. Калюсогенез рослин томату в культурі *in vitro* на МС-середовищі з ауксин-цитокініновим замітником

Дні обліку	Маса калюсних агрегатів, мг:				
	Контроль, МС-середовище	Екоцим, мг/л:		Екоцим 1, мг/л:	
		15,0	35,0	20,0	40,0
10-й	56,2 ± 2,4	54,7 ± 2,2	56,1 ± 2,3	55,0 ± 2,1	56,2 ± 2,2
20-й	73,0 ± 3,6	71,7 ± 3,3	72,7 ± 3,5	72,0 ± 3,7	72,9 ± 3,4
30-й	93,5 ± 4,2	91,8 ± 4,1	92,5 ± 4,3	92,0 ± 4,2	93,4 ± 4,6

Таблиця 2. Морфогенез рослин томату в культурі *in vitro* на МС-середовищі із ауксин-цитокініновим замітником

Дні обліку	Висота живців, см:				
	Контроль, МС-середовище	Екоцим, мг/л:		Екоцим 1, мг/л:	
		15,0	35,0	20,0	40,0
10-й	6,7 ± 0,4	6,2 ± 0,5	6,5 ± 0,5	6,3 ± 0,6	6,7 ± 0,4
20-й	8,2 ± 0,5	7,9 ± 0,7	8,1 ± 0,5	8,0 ± 0,5	8,2 ± 0,7
30-й	10,4 ± 0,7	10,1 ± 0,6	10,3 ± 0,5	10,2 ± 0,7	10,4 ± 0,7

Таблиця 3. Калусогенез рослин картоплі в культурі *in vitro* на МС-середовищі з ауксин-цитокініновим замітником

Дні обліку	Маса калусних агрегатів, мг				
	Контроль, МС-середовище	Екостим, мг/л:		Екостим 1, мг/л:	
		15,0	35,0	20,0	40,0
10-й	20,0 ± 1,1	18,8 ± 1,0	19,8 ± 1,0	19,2 ± 1,0	20,1 ± 1,1
20-й	31,2 ± 1,8	30,8 ± 1,7	31,1 ± 1,9	31,0 ± 1,8	31,4 ± 1,9
30-й	33,0 ± 1,9	32,2 ± 1,8	33,0 ± 1,6	32,7 ± 1,7	33,3 ± 1,8

Таблиця 4. Морфогенез рослин картоплі в культурі *in vitro* на МС-середовищі із ауксин-цитокініновим замітником

Дні обліку	Висота живців, см:				
	Контроль, МС-середовище	Екостим, мг/л:		Екостим 1, мг/л:	
		15,0	35,0	20,0	40,0
10-й	4,2 ± 0,4	4,0 ± 0,5	4,3 ± 0,4	4,1 ± 0,5	4,4 ± 0,6
20-й	7,3 ± 0,5	7,0 ± 0,5	7,2 ± 0,7	7,1 ± 0,5	7,3 ± 0,4
30-й	9,0 ± 0,5	8,8 ± 0,6	8,9 ± 0,5	8,9 ± 0,4	9,1 ± 0,4

Основними факторами, що регулюють процеси калусогенезу та морфогенезу, є штучні регулятори росту та способи культивування тканин і клітин. Роль штучних регуляторів росту у процесах поділу клітин у культурі *in vitro* на сьогодні уже вивчена достатньо глибоко, однак, суттєвий вплив на вибір виду конкретного регулятора виявляє видова приналежність, генотип, а також епігенетичні фактори. А тому підхід до кожної конкретної культури та сорту або гібриду залишається поки що емпіричним. Є також інформація про взаємозаміну ауксинів та цитокінінів. Спостерігається однаковий ріст за різних співвідношень цих регуляторів росту. Зниження концентрації ауксину у 10 разів компенсувалося десятикратним підвищенням концентрації цитокініну. При цьому можна передбачити, що цитокінін стимулює синтез ендogenous ауксину у клітинах, а також те, що за впливу цитокініну зростає поглинання ауксину із середовища та послаблюється його інактивація [12].

Необхідно також відзначити, що із групи ауксинів, які досить часто використовуються у культурі *in vitro*, зокрема ІОК, ІМК,  $\alpha$ НОК, 2,4Д мають не зовсім достатню активність. Це пояснюється, мабуть, тим, що вони досить легко руйнуються ферментом ІОК-оксидазою та відбувається утворення кон'югатів. Крім того, ауксин 2,4Д є широко використовуваним гербіцидом, що викликає дефоліацію у дводольних рослин [13, 14].

Дослідження на молекулярному рівні виявили закономірні зміни в експресії ауксин-чутливих генів та генів сигнальної системи ауксинів під час переходу до бульбоутворення у рослин картоплі. Перехід від поперечного до поздовжнього поділу клітин у субапикальній зоні супроводжувався багаторазовим зниженням рівня ауксинового транскрипційного фактора ARF6 [15]. Іншими дослідженнями було підтверджено, що експресія цілого ряду ауксин-залежних генів у підвиді картоплі *Solanum andigena* знижувалася у ранній період закладення бульб за набухання кінчика столона [16]. Але більш детальний аналіз показав, що експресія багатьох ауксин-чутливих генів у столоні різко зростала за ініціації бульб [17]. Серед цих генів були *StPIN*-гени транспорту ауксинів, *StYUC*-ген біосинтезу ауксинів, *arcA*-подібні гени та інші. Інструментальний аналіз вмісту ауксинів підтвердив його різке зростання у кінчику столона на початку росту бульб [18]. Але при цьому цілком можлива позитивна роль ауксинів у забезпеченні атрагуючої активності бульб, тому що перетворення цукрози, яка надходить до бульб, у запасний крохмаль сприяє притоку нових порцій асимілятів у ростучі бульби [19]. Також було з'ясовано, що співвідношення ендogenous цитокінінів та ауксинів суттєво впливає на ініціацію бульб [20]. Установлено, що внесення у середовище культивування екзогенних фітогормонів ІОК та кінетину неоднаково впливало на здатність до бульбоутворення у трансформатів та контрольних рослин – цей вплив

залежав від вмісту цукрози у середовищі. Фітогормони, особливо ауксин, загалом меншою мірою стимулювали бульбоутворення у трансформатів (порівняно із контрольними рослинами) [21]. Ця інформація підтверджує деяку неоднозначність у застосуванні синтетичних регуляторів росту пасльонових рослин у культурі *in vitro*.

Використані нами замітники фітогормонів мають рослинне походження – метаболіти грибів-ендофітів, виділених із коренів обліпихи та женьшеню. А препарати із рослин, порівняно із синтетичними, мають ряд переваг. Будучи досить складними за біохімічним складом, вони містять багато інгредієнтів, які мають досить цінні властивості та забезпечують багатосторонню дію на рослинний організм [22].

Загалом утворені у процесі диференціації клітин експлантів калуси характеризувалися морфологічною та структурною гетерогенністю, яка була зумовлена наявністю різних типів тка-

нин та клітин, що входять до їх складу. Оскільки здатність калусних культур до регенерації зумовлена наявністю компетентних до морфогенезу клітин, то збереження та переважне розмноження цих клітин, а також підбір фітогормонів для їх проліферації може сприяти більш тривалому збереженню морфогенного потенціалу калусними культурами.

### Висновки

Визначальними факторами живильного середовища, що ефективно регулюють активність ростових процесів рослинних клітин, культивованих *in vitro*, є фітогормони. Аналіз одержаних результатів дозволяє стверджувати, що оптимальним для росту калусної культури пасльонових рослин та морфогенезу є варіанти із застосуванням цитокінінових заміників Еко-стим та Еко-стим 1 із нормою витрати відповідно 35,0 і 40,0 мг/л.

### References

1. Tsyrenov V.Zh. Osnovy biotekhnologii. Kul'tivirovanie izolirovannykh kletok i tkaney rasteniy. Ulan-Ude, 2003. 28 s. [in Russian] / Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии. Культивирование изолированных клеток и тканей растений. Улан-Удэ, 2003. 28 с.
2. David K.M., Couch D., Braun N., Brown S., Grosclaude J., Perrot L. Rechenmann C. The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. *Plant J.* 2007. Vol. 50. P. 197–206.
3. Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature.* 2001. Vol. 409. P. 1060–1063.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. 1962. *Physiol Plant.* 15 (3). P. 473–497.
5. Perelik pestytsydiv i ahrokhimikativ, dozvolenykh do vykorystannia v Ukraini. K.: Yunivest Medii, 2018. 1039 s. [in Ukraine] / Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. К.: Юнівест Медія, 2018. 1039 с.
6. Butenko R.G. Plant cell culture and biotechnology. M., 1986. 344 p.
7. Kushnir H.P., Sarnats'ka V.V. Mikroklonal'ne rozmnozhenня roslin. K.: Naukova dumka, 2005. 270 s. [in Ukraine] / Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. К.: Наукова думка, 2005. 270 с.
8. Skoog F., Miller C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Molecular and Cellular Aspects of Development, E. Bell, ed., Harper and Row. New York, 1965. P. 481–494.
9. Reinert J., Yeoman M.M. Plant Cell and Tissue Culture. A. Laboratory Manual. Berlin: N.Y. Springer Verlag, 1982. 86 p.
10. Wernicke W., Milkovits L. Effect of auxin on the mitotic cell cycle in cultured leaf segments at different stages of development in wheat. *Physiol. Plant.* 1987. Vol. 69, № 1. P. 16–22.
11. Bregitzer P., Bushnell W.R., Rines H.W., Somers P.A. Callus formation and plant regeneration from somatic embryos of oat (*Avena sativa* L.). *Plant Cell Reports.* 1991. Vol. 10, № 2. P. 243–246.
12. Gamborg K.Z., Rekoslavskaja N.I., Shvetsov S.G. Aukliny v kul'turakh tkaney i kletok rasteniy. Novosibirsk: Nauka. Sib. Otd-nie, 1990. 243 s. [in Russian] / Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауклины в культурах тканей и клеток растений. Новосибирск: Наука. Сиб. Отд-ние, 1990. 243 с.
13. Yoshida F., Kohono H. Regulations of mineral and especially nitrogen nutrition to growth rate of plant cell cultures. *Plant cell culture.* 1987. Vol. 4, № 2. P. 53–59.
14. Hallaway M., Osborne D.J. Ethylene: a factor in defoliation induced by auxins. *Science.* 1969. Vol. 163, № 3871. P. 1067–1068.
15. Faivre-Rampant O., Cardele L., Marschall D., Viola R., Taylor M.A. Changes in Gene Expression during Meristem Activation Processes in *Solanum tuberosum* with a Focus on the Regulation of an Auxin Response Factor Gene. *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55. P. 613–622.
16. Hannapel D.J. Signalling in Induction of Tuber Formatio. In: Potato Biology and Biotechnology. Ed. Vreugdenhil D. Amsterdam: Elsevier, 2007. P. 237–256.
17. Kloosterman B., De Koeijer D., Griffiths R., Flinn B., Steuernagel B., Scholz U. et al. Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using the POCI array. *Funct. Integr. Genomics.* 2008. Vol. 8. P. 329–340.

18. Roumeliotis E., Kloosterman B., Oortwijn M., Kohlen W., Bouwmeester H.J., Visser R.G.F., Bachem C.W.B. The effects of auxin and strigolactones on tuber initiation and stolon architecture in potato. *Journal of experimental Botany*. 2012. Vol. 63, № 12. P. 4539–4548.
19. Mokronosov A.T. Klubneobrazovanie i donorno-aktseptornye svyazi u kartofelia. *Regulatsiia rosta i razvitiia u kartofelia*. Pod red. Chaylakhiana M.Kh. i Mokronosova A.T. M.: Nauka, 1990. S. 6–12. [in Russian] / Мокроносов А.Т. Клубнеобразование и донорно-акцепторные связи у картофеля. *Регуляция роста и развития у картофеля*. Под ред. Чайлаханя М.Х. и Мокроносова А.Т. М.: Наука, 1990. С. 6–12.
20. Machackova I., Konstantinova T.N., Sergeeva L.I., Lozhnikova V.N., Golyanovskaya S.A., Dudko N.D., Eder J., Aksenova N.P. Photoperiodic Control of Growth, Development and Phytohormone Balance in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant*. 1998. Vol. 102. P. 272–278.
21. Kolachevskaja O.O. Vliianie gena biosinteza auksina tms1 pod kontrolem klubnespetsificheskogo promotora na klubneobrazovanie kartofelia *in vitro*. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. Moskva, 2015. 23 s. [in Russian] / Колачевская О.О. Влияние гена биосинтеза ауксина tms1 под контролем клубнеспецифического промотора на клубнеобразование картофеля *in vitro*. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 2015. 23 с.
22. Fuller K.V. Chemicals from plant cell cultures - some biochemical and physiological pointers. *Chemistry and industry*. Oxford, 1984. Vol. 23. P. 825–833.

**KOVBASENKO R.V.<sup>1</sup>, DMITRIEV A.P.<sup>1</sup>, OLIYNIK T.M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 148*

<sup>2</sup> *Institute of Potato Studies of the National Academy of Sciences of Ukraine,*

*Ukraine, 07853, Kyiv region, Borodyansky district, Nemishayev town, Chkalov str., 22*

#### **APPLICATION OF AUXIN-CYTOKININ SUBSTITUTE *IN VITRO* CULTURE SOLANACEA CROPS**

**Aim.** The purpose of our research was to establish the possibility of initiation of potato and tomato culture plants using industrial growth regulators, which are legal for use in Ukraine, which include substances with pronounced auxin-cytokinin activity. **Methods.** In this work, we used varieties of tomato: *Khoriv*, *Borivsky* and *Bozhedar*, *Povin* potatoes. Work in culture *in vitro* was performed according to conventional methods. **Results.** A phytohormone substitute was created in a known nutrient agar medium according to Murasige-Skuga. For the *in vitro* cultivation of tomato and potato plants, phytohormones were replaced by solutions of Ecostim and Ecostim 1, which exhibited auxin-cytokinin activity. The cost of these substitutes is much lower than that of commercial phytohormones. **Conclusions.** It is shown that optimal for growth in the MS medium in the callusogenesis of Solanacea cultures *in vitro*. That variant with the use of cytokinin substitutes Ecostim and Ecostim 1 with the rate of using of 35.0 and 40.0 mg/l.

**Keywords:** modification of MS medium, potatoes, tomatoes, cell culture *in vitro*.