

УДК 57.085.2:635.34

ТАРАНЕНКО А.М., БАННИКОВА М.О., МОРГУН Б.В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: rotenar@rambler.ru, molgen@icbge.org.ua

СОРТОЗАЛЕЖНІ РОСТОВІ ПОКАЗНИКИ ТА РЕГЕНЕРАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ РІЗНИХ ЕКСПЛАНТІВ КАПУСТИ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Капуста білоголова (*Brassica oleracea* L.) є однією з найпоширеніших сільськогосподарських культур у країнах з помірним кліматом. Її висока харчова цінність пояснюється високим вмістом азотистих сполук (1,27–3,78 %), жирів (0,16–0,67 %), вуглеводів (5,25–8,56 %), присутністю фітонцидних сполук, вітамінів А, В₁, С, К, В₆, метіоніну, тощо. Харчова цінність 100 г продукту складає 24 Ккал [1].

Висока харчова та господарська цінність капусти білоголової робить її привабливим об'єктом для біотехнологічних досліджень. Таким чином, ми займалися підбором сорту з найвищими ростовими показниками та регенераційною здатністю.

Матеріали і методи

Насіння сортів Амагер, Білосніжка, Димерська 7, Екстра, Золотий гектар, Іюньська, Казачок, Кам'яна голова, Княгиня, Лангедейкер, Лангедейкер Дауер, Мегатон, Московська пізня, Слава 1305, Трансфер, Тюркіс, Українська осінь, Харківська зимова, Ярославна було введено у культуру *in vitro* [2].

У 4-х тижневих асептичних рослин капусти були проаналізовані ростові показники: довжина стебла (L, см), довжина кореневої системи (L₁, см), довжина (a, см) і ширина (b, см) листової пластинки, кількість листків (n), кількість коренів (n_к) на рослину [3].

Проводили підбір живильних середовищ для регенерації з різних експлантів капусти білоголової. В якості базового середовища використано МС [4] з половинним вмістом макросолей і різними концентраціями регуляторів росту. Проводили регенерацію з таких експлантів: меживузлів, листових дисків, гіпокотилів.

Враховуючи високий відсоток ураження насіння, отриманого із торгової мережі, патогенними агентами фунгальної і бактеріальної природи, було вивчено динаміку проростання попередньо стерилізованого насіння капусти на агаризованому середовищі МС, яке містило розчини комерційних фунгіцидів різних концентрацій («Maxim Star 025 FS» та «Квадріс 250 SC» (Syngenta,

Швейцарія)). Встановлювалася концентрація фунгіциду, яка при культивуванні інгібує фунгальне зараження, не перешкоджаючи розвитку рослини. В якості контролю використовувалося насіння, пророщене на середовищі МС без фунгіцидів. Після пророщування двотижневі гіпокотилі насікалися, і переносилися на середовище для калусоутворення. Склад середовища для калусоутворення був наступним: макро- та мікросолі МС, 30 г/л сахарози; 300 мг/л інозиту; 300 мг/л гідролізату казеїну; 2 мг/л 2,4-Д; 0,1 мг/л БАП; 1 мг/л НОК; 0,1 мг/л кінетину. Інкубування проводилося протягом 4 діб при 24 °С без доступу світла, після чого експланти переносили на середовище для регенерації.

Живильні середовища для регенерації на базі середовища МС з половинним вмістом макросолей і 10 г/л сахарози відрізнялися вмістом регуляторів росту [5, 6].

Тестували середовища з наступними варіантами вмісту регуляторів росту:

для меживузлів: 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК; 1 мг/л БАП, 1 мг/л НОК;

для листових експлантів: 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатину, 1 мг/л АБК, 1 мг/л НОК і 1 мг/л ГК; 3 мг/л БАП;

для гіпокотилів: варіабельно 0,1; 0,3; 0,5; 1 мг/л НОК; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 мг/л БАП; 2 мг/л 2,4-Д.

За результатами досліджень були підібрані оптимальні варіанти середовищ для регенерації конкретно для кожного типу експлантів, а також було визначено рослини яких сортів найкраще регенерують.

Результати та обговорення

За результатами аналізу ростових показників 4-тижневих рослин капусти встановлено, що найвищі показники росту і вкорінення у культурі *in vitro* притаманні рослинам 5 сортів: Амагер, Лангедейкер, Мегатон, Слава 1305, Харківська зимова з 19 проаналізованих. Рослини наведених сортів було використано для подальших досліджень (табл. 1).

При пророщуванні попередньо стерилізованого насіння на середовищі МС із фунгіцидами було визначено, що додавання у середовище фунгіцидів у розведенні 1:300 і цефотаксиму 500 мкг/мл, дозволило мінімізувати прояви бактеріальної і фунгальної інфекції (0,5–1,5 % ураженого насіння). Застосування суміші фунгіциду і антибіотику, або системного фунгіциду «Maxim Star 025 FS» у розведенні 1:100, призвело до повного пригнічення патогенної активності. Також було показано, що присутність даних фунгіцидів у живильному середовищі мінімально впливає на проростання насіння (втрата схожості становить 1–3,5 %, залежно від сорту капусти і концентрації фунгіциду), проте впливає на морфологію проростків—спостерігалось вкорочення та потовщення гіпокотилів.

При регенерації капусти з меживузлів на середовищі МС з половинним вмістом макросолей і 10 г/л сахарози, а також різним вмістом регуляторів росту, найбільший відсоток регенерації спостерігали у рослин сортів Лангедейкер і Харківська зимова (табл. 2). При додаванні в регенераційне середовище 1 мг/л БАП, 1 мг/л НОК показники регенерації були 54,6±1,12 % – для рослин сорту Лангедейкер і

46,1±2,11 % – для рослин сорту Харківська зимова. При додаванні в регенераційне середовище 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК показники регенерації були 76,3±0,84 % – для рослин сорту Лангедейкер і 69,6±1,94 % – для рослин сорту Харківська зимова. Таким чином, оптимальною концентрацією регуляторів росту є 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК.

При регенерації капусти з листових експлантів на середовищі МС з половинним вмістом макросолей і 10 г/л сахарози, а також різним вмістом регуляторів росту, найбільший відсоток регенерації спостерігали у рослин сортів Лангедейкер, Амагер і Харківська зимова (табл. 3). При додаванні в регенераційне середовище 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатину, 1 мг/л АБК, 1 мг/л НОК і 1 мг/л ГК показники регенерації були 31,3 ± 1,74 % – для рослин сорту Лангедейкер, 24,5 ± 1,86 % – для рослин сорту Амагер, і 28,2 ± 1,27 % – для рослин сорту Харківська зимова. При додаванні у регенераційне середовище 3 мг/л БАП показники регенерації були 29,8 ± 2,05 % – для рослин сорту Лангедейкер, 27,1 ± 3,01 % – для рослин сорту Амагер, і 27,6 ± 2,08 % – для рослин сорту Харківська зимова.

Таблиця 1. Параметри росту рослин, що належать до відібраних сортів

Сорт	L, см	L ₁ , см	a, см	b, см	n	n _к
Амагер	6,2±0,531	6,3±0,657	2,8±0,303	2,6±0,309	3,3±0,497	3,7±0,221
Лангедейкер	4,8±0,336	6,9±0,517	4,1±0,198	4,3±0,212	3,2±0,423	5,2±0,318
Мегатон	2,2±0,318	5,7±0,359	3,7±0,206	3,5±0,288	3,1±0,257	3,9±0,359
Слава 1305	4,2±0,311	5,8±0,538	4,1±0,179	3,8±0,208	3,0±0,392	4,7±0,281
Харківська зимова	4,1±0,362	5,6±0,297	3,7±0,214	3,6±0,227	3,3±0,468	5,1±0,364

Примітка: L – довжина стебла, L₁ – довжина кореневої системи, a – довжина листової пластинки, b – ширина листової пластинки, n – кількість листків на рослину, n_к – кількість коренів на рослину.

Таблиця 2. Частота регенерації пагонів капусти із меживузлів

Сорт	0,5МС + 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК	0,5МС + 1 мг/л БАП, 1 мг/л НОК
Амагер	59,1 ± 1,76 %	28,7 ± 0,98 %
Лангедейкер	76,3 ± 0,84 %	54,6 ± 1,12 %
Мегатон	52,4 ± 1,27 %	24,2 ± 0,83 %
Слава 1305	62,4 ± 0,68 %	29,7 ± 1,07 %
Харківська зимова	69,6 ± 1,94 %	46,1 ± 2,11 %

Таблиця 3. Частота регенерації пагонів капусти із листових експлантів

Сорт	0,5МС + 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатину, 1 мг/л АБК, 1 мг/л НОК і 1 мг/л ГК	0,5МС + 3 мг/л БАП
Амагер	24,5 ± 1,86 %	27,1 ± 3,01 %
Лангедейкер	31,3 ± 1,74 %	29,8 ± 2,05 %
Мегатон	18,7 ± 1,46 %	21,8 ± 1,84 %
Слава 1305	22,7 ± 0,93 %	25,1 ± 1,76 %
Харківська зимова	28,2 ± 1,27 %	27,6 ± 2,08 %

При регенерації капусти з гіпокотилів на середовищі МС з половинним вмістом макросолей і 10 г/л сахарози, а також різним вмістом регуляторів росту, було показано, що оптимальними концентраціями регуляторів росту є: 0,1–0,3 мг/л НОК, 1–2 мг/л БАП. Найвищі показники регенерації з гіпокотилів показали сорти Лангедейкер (0,3 мг/л НОК, 1 мг/л БАП, 2 мг/л 2,4-Д; регенерація $81,8 \pm 2,71\%$), Слава 1305 (0,1 мг/л НОК, 1 мг/л БАП, 2 мг/л 2,4-Д; регенерація $76,2 \pm 2,13\%$), Харківська зимова (0,3 мг/л НОК, 1,5 мг/л БАП, 2 мг/л 2,4-Д; регенерація $78,7 \pm 1,97\%$). Таким чином, рослини цих сортів виявили найвищу регенераційну здатність, і можуть бути в подальшому результативно використані для потреб генетичної інженерії.

Висновки

У ході роботи було досліджено особливості росту і вкорінення в культурі *in vitro* рослин 19 сортів капусти білоголової (*B. oleracea*). Встановлено умови пророщування, які запобігають розвитку фунгального і

бактеріального ураження насіння. Проведено регенерацію рослин 5 сортів із різних типів експлантів: меживузлів, листкових, гіпокотилів. Встановлено, що найвищі показники регенерації виявляють рослини сортів Лангедейкер і Харківська зимова, незалежно від типу експланту. Найвищий відсоток регенерації спостерігається при використанні у якості експлантів меживузлів і гіпокотилів. Для подальшої роботи будуть використані сорти Лангедейкер і Харківська зимова та їх гіпокотилі у дослідах із генетичної трансформації.

Робота проводилася у рамках наукового проекту «Отримання та вивчення молекулярно-біологічних і генетичних особливостей стійких до гербіцидів сільськогосподарсько важливих культур» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (№ держреєстрації 0110U006082).

Література

1. Синская Е.Н. Род 649. Капуста – *Brassica* // Флора СССР / Ботанич. ин-т Акад. наук СССР; Гл. ред. акад. В. Л. Комаров; Ред. VIII тома Н. А. Буш. – М.–Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1939. – VIII. – С. 459–466.
2. Тараненко А.М., Банникова М.О., Нітовська І.О., Моргун Б.В. Дослідження ефективності стерилізації насіння капусти городньої (*Brassica oleracea*) з використанням фунгіцидів // Тези VI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», 5 квітня 2012 р. – Київ. – С. 118–119.
3. Пиголева С.В., Захарченко Н.С., Пиголев А.В., Троценко Ю.А., Бурьянов Я.И. Влияние колонизирующих метиловых бактерий на морфогенез и устойчивость к *Erwinia carotovora* сахарной свеклы и капусты белокачанной // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – 49, № 6. – С. 670–676.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15. – P. 473–497.
5. Сахно Л.А., Гочева Е.А., Комарницький І.К., Кучук Н.В. Стабільна експресія беспроторного гена *bag* в трансформованих рослинах рапса // Цитология и генетика. – 2008. – № 1. – С. 21–28.
6. Городенська М.М., Нітовська І.О., Кучук М.В. Вивчення регенераційної здатності стеблових експлантів рослин родини Brassicaceae // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007. – 39, № 3. – С. 255–263.

TARANENKO A.M., BANNIKOVA M.O., MORGUN B.V.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnoho str., 148, e-mail: rotenar@rambler.ru, molgen@icbge.org.ua

VARIETY-DEPENDENT GROWTH DATA AND REGENERATION ABILITY OF DIFFERENT CABBAGE EXPLANTS *IN VITRO*

Aims. High nutritional and economic value of cabbage makes it an attractive model for biotechnology research. Thus, we were engaged in the selection of cabbage varieties, with the aim to get the transgenic cabbage in future. **Methods.** Using commercial fungicides, we established the conditions for the germination of seeds which prevent the development of fungal and bacterial infection of seeds. In addition we tested and selected nutrient media for regeneration of different explants of cabbage. As a basic medium the MS was used with various concentrations of plant growth regulators. **Results.** The conditions of growth and *in vitro* establishment of 19 varieties of cabbage have been studied. It was shown that the highest percentage of regeneration occurred when using the cabbage hypocotyl explants of Langedijker ($81.8 \pm 2.71\%$) and Kharkivska zymova ($78.7 \pm 1.97\%$) varieties but the best results were obtained for 5 varieties.

Conclusions. The optimum compositions of regenerative medium for each variety were defined. Explants of Langedijker and Kharkivska zymova will be used for the further genetic transformation experiments.
Key words: *Brassica oleracea* L., regeneration, explants, fungicide.

УДК 602.6:58:633.181.1

ШЕСТОПАЛ О.Л.¹, ЗАМБРІБОРЩ І.С.¹, ІГНАТОВА С.О.¹, ШПАК Д.В.²

¹ Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com

² Інститут рису Української академії аграрних наук, Україна, 75705, с. Антонівка, Скадовський р-н, Херсонська обл., e-mail: shpak_dmitry@mail.ru

ВПЛИВ ПОПЕРЕДНЬОЇ ОБРОБКИ ВОЛОТЕЙ НА МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *ORYZA SATIVA* L.

За результатами наших попередніх (2011–2012 рр.) досліджень андрогенезу *in vitro* *Oryza sativa* L. [1, 2] показана перспективність та результативність проведення даних робіт в умовах Півдня України. Перевага методів культури *in vitro* над прийомами традиційної селекції стосується, насамперед, отримання гомозиготного лінійного матеріалу в значно короткий термін [3, 4]. Подальший розвиток досліджень андрогенезу *in vitro* рису можливий у напрямку збільшення числа подвоєних гаплоїдів серед рослин-регенерантів та підвищення адаптивного потенціалу останніх. Показано, що індукція андрогенного калюсу та подальша регенерація у рису підвиду *Indica* надзвичайно низькі, на відміну від подібних показників у сортів підвиду *Jaronica*. У рису, як показано різними авторами, частота індукції коливатиметься від 10 % до 100 % в залежності від генотипу [5]. Мета дослідження – вивчити вплив різних варіантів попередньої обробки волотей рису на процеси індукції та регенерації в культурі пиляків рису.

Матеріали і методи

В якості рослинного матеріалу застосовували пиляки гібридів F₂: Преміум х УкрНДС 7761 (№ 103); Агат х Віконт (№ 106); Агат х Аметист (№ 114); Адмірал х Хазар (№ 128); Рапан х Україна 96 (№ 131), які вирощували в рисових чеках Інституту рису (м. Скадовськ). Волоті зрізали, коли мікроспори у пиляках знаходились на стадії середньо-пізньої вакуолізації. Зрізані волоті, у покривному листку, поміщали у воду та водний розчин абсцизової кислоти (АБК) і зберігали 3–7 діб у кліматичній камері за температури + 6 °С – + 8 °С. Волоті, звільнені від покривного листка, поміщали у чашки Петрі (150 мм). Стерилізацію проводили розчином комерційного препарату

«Білизна» протягом 5 хв. Надалі зливали дезінфікуючий засіб і додавали 0,05 н розчин НСІ (10 хв.) з наступним п'ятиразовим промиванням дистильованою водою.

Для індукції новоутворень використовували живильне середовище N₆ за модифікацією Herath [6] з додаванням фітогормонів: 2,4-Д – 3 мг/л, НОК – 1 мг/л, кінетин – 1 мг/л і 60 г/л цукрози. Для культивування новоутворень використовували живильне середовище – МС з додаванням 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК. Для регенерації рослин – живильне безгормональне середовище MS із половинним складом макро- та мікросолей.

Пиляки експлантували на живильне середовище N₆ у чашки Петрі (ш 60 мм) та культивували у термостаті при + 25 °С. Новоутворення пересаджували у 2 етапи (I етап – через 4–5 тижнів культивування пиляків; II етап – через 7–8 тижнів культивування) на дане живильне середовище та культивували при освітленні та температурі + 26 °С.

Результати та обговорення

Проведено дослідження оцінки гаплопродукційної здатності п'яти гібридів F₂ рису, показана висока чутливість даних форм до наданих умов культивування пиляків *in vitro*. Слід зазначити, що значний рівень, як формування новоутворень, так і регенерації з них, був характерним для усіх наданих гібридних комбінацій (табл. 1), однак він мав нижчі показники в порівнянні з тогорічними результатами [2, 7].

Слід зазначити, що в нашій лабораторії (єдине місце на теренах України) дослідження в галузі біотехнології з отримання *in vitro* гаплоїдів рису проводяться з 2011 року. Наші дослідження спрямовані на модифікацію та адаптування оригінальних напрацьованих