

Резюме

Установлены основные абиотические и биотические факторы, влияющие на процесс прямой регенерации *in vitro* эфиромасличных и лекарственных растений. Показана роль генотипа, концентрации ТДЗ, количества субкультивирований, расположения листовых дисков на питательной среде и интенсивности освещения в системе прямой регенерации растений иссопа и котовника.

Встановлено основні абіотичні та біотичні фактори, які впливають на процес прямої регенерації *in vitro* ефіроолійних і лікарських рослин. Показано роль генотипу, концентрації ТДЗ, кількості субкультивувань, розташовування листових дисків на поживному середовищі та інтенсивності освітлення у системі прямої регенерації гісопу та м'яти котячої.

The main abiotic and biotic factors influencing on process of direct regeneration *in vitro* essential oil and medical plants were established. The role of genotype, TDZ concentration, number of subcultivation, placing of leaves disks on culture medium and intensity of illumination in the system of direct regeneration in hyssop and nep plants was demonstrated.

**МИХАЛЬСКАЯ С.И., КОМИСАРЕНКО А.Г., МАЛИНА А.Э.,
БРОННИКОВА Л.И., ТИЩЕНКО Е.Н.**

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 0302, Киев, ул. Васильковская 31/17, e.mail:oltyko@gmail.com*

ВЛИЯНИЕ ТИОСУЛЬФАТА НАТРИЯ НА ИНДУКЦИЮ РЕГЕНЕРАЦИИ *IN VITRO* ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Для генетического улучшения подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) биотехнологическими методами за последние десятилетия предложено ряд перспективных систем регенерации *in vitro* [1-3]. Вместе с тем реализации морфогенетического потенциала многих сельскохозяйственно-ценных линий и гибридов *H. annuus* свойственна низкая эффективность и вариабельность.

Регенерация *in vitro* подсолнечника может осуществляться путём прямого/непрямого как органогенеза, так и соматического эмбриогенеза [1-5]. При этом отмечается зависимость от типа эксплантата, а также генотипа, условий культивирования и их взаимодействия. Имеются сведения и о генотипическом контроле показателей - количество побегов на общее количество эксплантатов и на регенерирующий эксплантат [6,7]. На индукцию регенерации оказывают влияние регуляторы роста, углеводы, в ряде случаев повышению побегообразования способствуют органические и неорганические компоненты, в частности аминокислоты, гидролизат казеина, KNO₃ [4, 5, 8].

Цель данного исследования – оценка эффективности применения тиосульфата натрия для повышения частоты регенерации *in vitro* из сегмента проростка инбредных линий и гибридов подсолнечника.

Материалы и методы

Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника 96А/3, 16А/3, 70А/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института, УААН).

Зрелые ядра семян стерилизовали последовательно 96% этанолом (2 мин) и 15% раствором хлорамина (30-40 мин), затем трехкратно промывали автоклавированной дистиллированной водой и высаживали на агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС). Культивировали 3-4 дня при температуре 25–26 °С, 16-часовом фотопериоде и освещённости 3-4 клк.

3-4-дневные проростки делили пополам вдоль зародышевой оси, удаляли корешок и апикальную меристему с примордиями листьев. В качестве первичного

эксплантата использовали сегмент проростка, состоящий из $\sim 1/2$ нижней части семядоли с расщеплённой верхней частью гипокотилия размером 1-2 мм. Для индукции регенерации *in vitro* эксплантаты (по 20 штук на чашку Петри) высаживали на модифицированную нами питательную среду МС (МСМ) и среду МСМ дополненную тиосульфатом натрия (МСМТ), в концентрациях 10 - 100 мг/л. рН питательной среды до автоклавирования составлял 5,7 – 5,8. Культивирование проводили при условиях, указанных выше. Укоренение осуществляли на МСМ-среде без фитогормонов.

Частоту побегообразования исследуемых генотипов оценивали как отношение количества регенерантов к общему числу эксплантатов. Для каждого генотипа учитывали результаты 6 - 10-кратных повторностей опыта. При статистической обработке результатов сравнительного исследования применяли критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Одним из важных факторов, определяющих эффективность индукции регенерации *in vitro* подсолнечника, является природа эксплантата, а также стадия развития растений, из которого он вычленяется. Скрининг различных эксплантатов на модифицированной нами среде МСМ показал, что для тестируемых генотипов органогенез *in vitro* надёжно и воспроизводимо осуществлялся при использовании сегмента проростка, состоящего из нижней части семядоли совместно с верхней частью гипокотилия. При этом максимальная частота регенерации, осуществляемой путём прямого органогенеза, наблюдалась для эксплантатов, полученных от 3-4-дневных проростков подсолнечника. Появление первых побегов было чётко различимо уже на 6-7 день культивирования на средах для индукции регенерации МСМ и МСМТ.

Следует отметить, что для индукции побегообразования использовали среды МС, Гамборга, Нича и их модификации, в которых варьировали количественным и качественным составом регуляторов роста, органических и неорганических добавок. Значительный интерес вызвал тиосульфат натрия, наличие которого могло приводить к повышению индукции побегообразования, особенно для генотипов с низким морфогенетическим потенциалом. Так, на средах МСМ и МСМТ для гибрида Злыва частота побегообразования достоверно не отличалась, в то время как для гибридов Заклык, Згода, Зубр, Урсус наблюдалось увеличение этого показателя.

В таблице приведены результаты исследования влияния различных концентраций тиосульфата натрия на индукцию регенерации инбредных линий подсолнечника. Полученные данные свидетельствуют о том, что для всех тестируемых линий происходит повышение частоты регенерации, однако ответная реакция эксплантата на этот фактор питательной среды была неоднозначная. Наблюдаются как количественные различия, так и изменения в динамике реализации морфогенетического потенциала. Так, хотя достоверное увеличение частоты регенерации у инбредных линий имеют место при одной и той же концентрации тиосульфата натрия, равной 20 мг/л, у линии 96А/3 имеется чётко выраженный максимум в диапазоне 10 – 30 мг/л, тогда как у линий 70А/3 и 16А/3 по мере увеличения содержания этого компонента питательной среды вплоть до 100 мг/л достоверных изменений не происходит. В то же время частота побегообразования у линии 96А/3 падает приблизительно в 2 раза. Это означает, что для проявления максимального положительного эффекта действия на реализацию морфогенетического потенциала подсолнечника необходимо и достаточно ~ 20 мг/л тиосульфата натрия. Можно предположить, что это соединение стимулирует пролиферацию клеток гипокотилия, способных к дальнейшей дифференцировке.

В целом, присутствие тиосульфата натрия в питательной среде привело к статистически достоверному повышению частоты побегообразования инбредных линий 96А/3, 70А/3 и 16А/3 приблизительно в 1,3, 1,7 и 2,8 раза, соответственно. Различное влияние тиосульфата натрия на реализацию морфогенетического потенциала

линий 96А/3, 70А/3, 16А/3 свидетельствует о генотипической зависимости индукции побегообразования подсолнечника от этого компонента питательной среды.

Таблица

Частота побегообразования инбредных линий подсолнечника при различных концентрациях тиосульфата натрия

Линии	Частота регенерации, %					
	Концентрация тиосульфата натрия, мг/л					
	0	10	20	30	50	100
96А/3	31,3±2,0	38,7±2,9 (1,24)	41,5±2,3 (1,33)	41,4±2,7 (1,32)	31,3±4,9 (1)	19,8±3,5 (0,63)
70А/3	20,2±4,6	32,5±2,6 (1,61)	33,5±2,0 (1,66)	31,8±2,5 (1,57)	36,1±2,0 (1,79)	36,3±3,5 (1,80)
16А/3	13,9±2,0	30,8±3,6 (2,22)	36,4±2,4 (2,87)	31,6±3,5 (2,27)	39,0±1,2 (2,80)	39,0±1,3 (2,80)

Примечание: в скобках указано значение отношения средних частот регенерации с и без тиосульфата натрия.

При культивировании на средах МСМ и МСМТ индукция регенерации могла осуществляться и путем множественного побегообразования. Однако, если на питательной среде с тиосульфатом натрия для всех генотипов было характерно наличие не менее 2-х побегов на регенерирующий эксплантат (появление 4 – 5 регенерантов было редким событием), то на МСМ этот показатель для инбредные линии 96А/3, 16А/3 и 70А/3 составлял преимущественно 1.

Таким образом, показана эффективность применения тиосульфата натрия для повышения индукции побегообразования из эксплантата - сегмента семядоли с частью гипокотилия проростков инбредных линий и гибрида подсолнечника. Предложенный метод регенерации путем прямого органогенеза может быть использован при разработке системы методов генетической трансформации.

Литература

1. Lucas O., Kallerhoff J., Alibert G. Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus L*) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* //Molecular Breeding.- 2000. - 6. - P. 479-487.
2. Muller A., Iser M., Hess D. Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus L.*), using a non-meristimatic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker // Transgenic Research. – 2001. – 10. – 435-444.
3. Everett N.P., Robenson K.E.P., Mascarenhas D. Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus L*) // Biotechnology.-1987. – 5, N11. – P.1201-1204.
4. Dong-Ho Shin D.-H., Kim J.S., Yang J., On S.K., Chung G.C., Han K-H. A shoot regeneration protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus L.*) // In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant. – 2000. – 36. – P. 273-278.
5. Alibert G., Aslane-Chanabe C., Burrus M. Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology // Plant Physiol. Biochem. - 1994. – 32. – P.31-44.
6. Deglene L., Lesignes P., Alibert G., Saffari A. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*) // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1997. – 48. – P. 127-130.
7. Flores Berrious E, Gentzbittel L., Kayyal H., Alibert G., Sarrafi A. AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus L.*) // Theor Appl Genet. – 2000. – 101. – P.1299-1306.
8. Espinasse A., Lay C. Shoot regeneration of callus derived from globular to torpedo embryos from 59 sunflower genotypes // Crop Sci – 1989. – 29. - 201-205.

Резюме

С использованием тиосульфата натрия показано увеличение индукции регенерации подсолнечника путём прямого органогенеза из сегмента 3-4-дневных проростков, состоящего из части семядоли с гипокотилем.

Використовуючи тиосульфат натрію, встановлено підвищення індукції регенерації соняшника шляхом прямого органогенезу із сегменту 3-4 денних проростків соняшника, до якого входить частина сім'ядолі з гіпокотилем.

Using thiosulfate Na, the increase of sunflower regeneration induction from segment of seedling 3-4-days after germinating which consist of fragment of cotyledon with hypocotyl by direct organogenesis was shown.

ОВЧАРЕНКО О.О., РУДАС В.А., КУЧУК М.В.

*Институт клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
03143, Київ, вул. Заболотного, 148 E-mail: iicb@iicb.kiev.ua*

РОЗРОБКА УМОВ ВИДІЛЕННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОТОПЛАСТІВ РОСЛИН РОДУ PHALAEENOPSIS

Тропічні та субтропічні види родини Orchidaceae є популярним об'єктом у квітникарстві. Широке культивування орхідей обумовлене їх високою декоративністю, довголіттям та тривалим періодом цвітіння. Розмноження орхідей традиційними методами (поділ, живцювання) - тривале, має низький коефіцієнт розмноження, придатне не для всіх видів. Насіннєве розмноження також довгий час становило труднощі через те, що для проростання насіння орхідних з недорозвиненими зародками необхідне створення симбіозу з певними видами грибів, крім того отримані таким чином сіянці часто зацвітають у віці понад 10 років [1]. Метод культури *in vitro* дозволив скоротити час від висіву насіння до цвітіння та масово розмножувати елітні екземпляри [1]. Слід зазначити, що хоча представники родини Orchidaceae досить легко утворюють статеві гібриди, іноді навіть між трьома або чотирма родами, між деякими родами статєва гібридизація неможлива. Тому для подолання статевої несхрещуваності варто було б використати метод соматичної гібридизації. Проте, остання неможлива без розробки методики культивування протопластів. Відомо лише кілька робіт по культурі протопластів родини Orchidaceae [2 - 8].

Одним з цікавих представників цієї родини є рід *Phalaenopsis*, чи не найпопулярніший в культурі завдяки здатності до росту в кімнатних умовах, відносній невибагливості. Статєві гібриди роду *Phalaenopsis* отримані лише з родами *Doritis* (*Doritaenopsis*), *Renanthera* (*Renanthopsis*) та *Vanda* (*Vandaenopsis*) [9], що відкриває широкі можливості для отримання нових гібридів шляхом соматичної гібридизації. Тому метою нашої роботи було розробити методику виділення та культивування протопластів роду *Phalaenopsis*.

Матеріали і методи

В роботі було використано асептичні рослини фаленоплицу (*Phalaenopsis* Blume), отримані з насіння внаслідок схрещування двох різних гібридних форм фаленоплицу, придбаних з колекції Центрального ботанічного саду ім. М. М. Гришка. Запилення та введення насіння в культуру *in vitro* проводили за методикою наведеною в монографії Т.М Черевченко [1]. Насіння висівали на тверде живильне середовище Огс (табл.1). Насіння пророщували при температурі 25°C, освітленості 500 лк, фотоперіоді – 16 год. Надалі, утворені з насіння асептичні протокорми підтримували в культурі *in vitro* пасажуванням на свіже живильне середовище Огс. Для експериментів