

7. Amoah B.K., Wu. H. Sparks, C., Jones H.D. Factors influencing Agrobacterium – mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue // *Jorn. of Exper. Botany.* – 2001. - V. 52. – N. 358. – P. 1135-1142
8. 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.
9. 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.
10. 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.

Резюме

Исследовали влияние ультразвука на регенерационную способность инбредных линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) 96A/3, 16A/3 и 70A/3. Показано, что повышение частоты регенерации путём прямого органогенеза зависит от генотипа и что ультразвуковая обработка не оказывает существенного влияния на процессы множественного побегообразования.

Досліджували вплив ультразвуку на регенераційну здатність інбредних ліній соняшника (*Helianthus annuus* L.) 96A/3, 16A/3 и 70A/3. Встановлено, що підвищення частоти регенерації шляхом прямого органогенезу залежить від генотипу та що ультразвукова обробка не має значного впливу на процеси множинного пагануотворення.

The ultrasound affect on regeneration possibility of inbred lines (*Helianthus annuus* L.) 96A/3, 16A/3 и 70A/3 are studied. It has been shown that increase of regeneration frequency by direct organogenesis depends on genotype, as well as the sonication don't influence on processes of multiply shoot formation.

КОРМИЛЬЦЕВ Б.Ф.

Институт сельского хозяйства Полесье УААН

Киевское шоссе 131, Житомир, 10007, Украина, E-mail: isgpo@polesye.net

КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ ХМЕЛЯ (HUMULUS LUPULUS L)

Хмель является важной технической культурой незаменимой для пивоварения, продукция которого также используется в фармакологии и парфюмерии.

Биотехнологические исследования, проводимые с этой культурой, касались в основном разработки методов культуры апикальных меристем с целью оздоровления растений от вирусных болезней [1,2] и созданию технологий микрклонального размножения [3,4,5].

Работам по изучению каллусогенеза в культуре тканей хмель уделялось мало внимания. Известны лишь отдельные публикации, в которых авторы частично затрагивают некоторые аспекты индукции каллусогенеза в контексте разработки методов размножения [6,7].

Известно, что каллусная ткань может служить источником генетического разнообразия и применяться для создания новых генотипов, а также доработки и улучшения сортов. На основе каллусной ткани разрабатываются биотехнологии для получения различных незаменимых для промышленности и фармакологии органических соединений вторичного метаболизма [8,9].

Целью настоящей работы было изучить условия каллусо- и морфогенеза различных соматических тканей хмеля в культуре *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили регенеранты хмеля сортов Альта, Оболонский и Хмелеслав полученные из апикальных меристем методом культуры *in vitro*. В качестве эксплантов использовали сегменты листьев, стеблей и черешков. Индукцию каллусогенеза и дальнейшее культивирование каллуса осуществляли на среде Мурашига – Скуга (MS) с добавлением различных фитогормонов. Пассирование культур проводили через каждые 30 дней. Экспланты культивировали в культуральных комнатах при температуре $25^0 \pm 1$ С, относительной влажности воздуха 70-80%, 16 часовом фотопериоде и освещенности 1,5-2,0 клюкс. Определение роста каллусной ткани проводили по приросту сырой массы каллуса после 30 суток культивирования. Для критерия служил относительный прирост каллусной массы (m_0 / m_t). Опыты проводили в трёхкратной повторности по 25 эксплантов в каждой повторности.

Результаты и обсуждения

Интенсивность развития каллуса у эксплантов хмеля на разных средах существенно отличалась. Экспланты стебля и черешка, высаженные на среду MS не содержащую фитогормонов, сохраняли свою жизнеспособность на протяжении всего времени наблюдения (2мес.), но каллус не образовывали. Ткани листа гибли раньше, но приблизительно у 5% из них отмечалось незначительное образование каллуса.

Из фитогормонов, которые были испробованы в экспериментах только 6-БАП и в меньшей степени 2,4-Д индуцировали каллусогенез (табл.1). Начало каллусообразования у эксплантов хмеля наблюдалось через 1-2 недели после начала культивирования в зависимости от вида ткани и состава среды.

На средах к которым добавляли β- ИУК или НУК в концентрациях 0,5 – 5,0 мг/л каллус не образовывался или был незначительным. В то же время ауксины в концентрациях 2,5 – 5,0 мг/л стимулировали образование корешков у всех видов тканей. Реже всего ризогенез наблюдался у черешков, высаженных на среду отдельно, но черешки, которые содержали сегменты листа, образовывали корни в два раза чаще. Экспланты сортов Хмелеслав и Альта одинаково реагировали на внесение в среду ауксинов, тогда как ризогенез у эксплантов сорта Оболонский на этих средах был менее выражен.

Таблица 1

Влияние фитогормонов на индукцию каллусогенеза различных тканей хмеля.

Состав фитогормонов (мг/л)	стебли			листья		
	Процент каллусообразования (%)	Процент ризогенеза (%)	Интенсивность каллусообразования	Процент каллусообразования (%)	Процент ризогенеза (%)	Интенсивность каллусообразования
ИУК 1,0	-	-	-	-	-	-
2,5	-	16	-	-	-	-
5,0	12	92	+	-	24	-
НУК 1,0	-	-	-	-	-	-
2,5	-	-	-	-	-	-
5,0	16	84	+	-	16	-
2,4Д 1,0	-	-	-	20	-	+
2,5	32	8	+	36	-	+
5,0	64	32	++	84	12	++
кинетин 1,0	-	-	-	-	-	-
2,5	-	44	-	-	16	-

	5,0	48	80	+	28	56	+
БАП	1,0	8	-	+	12	-	+
	2,5	68	-	++	52	-	++
	5,0	80	16	++	88	-	++
ИУК +БАП							
	2,0 + 2,0	100	-	++	100	-	+++
	2,0 + 5,0	100	4	+++	100	-	+++
	5,0 + 2,0	94	24	+++	100	16	+++
	5,0 + 5,0	100	28	+++	100	8	+++

- отсутствие каллуса; + слабое развитие каллус; ++ среднее развитие каллуса; +++ интенсивное развитие каллуса.

Как видно из таблицы влияние кинетина на каллусо- и ризогенез было подобным действию ауксинов. Тогда как 6-БАП индуцировал главным образом образование каллуса. Ткани листа были более чувствительны к действию цитокининов, чем ткани других органов хмеля и быстрее образовывали каллус и корни.

В меньшей степени реагировали на внесение в среду цитокининов ткани черешка. На всех средах они образовывали незначительное количество каллуса и лишь в отдельных случаях корни.

Наиболее интенсивно образование каллусной ткани наблюдалось на средах, в которые вносили БАП и ауксины одновременно. При этом различие в концентрации фитогормонов не имела значения.

Экспланты стебля на всех средах образовывали плотный крупнозернистый каллус желтоватого оттенка. Сегменты листа и черенка на средах, не содержащих БАП, образовывали мелкозернистый каллус белого или салатного цвета. При дальнейшем культивировании структура каллуса менялась. Основная каллусная масса ещё сильнее уплотнялась, формировала куполообразную форму, на срезе которой чётко выделялась дифференциация тканевых структур. Часть клеток каллуса быстро старела, приобретала темно-коричневый цвет и вскоре отмирала. А часть образовывала молодой рыхлый каллус бесцветный или светло-жёлтой окраски.

С целью оптимизации условий культивирования каллусной ткани нами изучалось влияние фитогормонального состава сред на прирост каллусной массы. Для стабилизации условий эксперимента каллусную ткань выдерживали в течение двух недель на среде MS без фитогормонов. Далее отбирали по 80 ± 2 мг/л молодого рыхлого каллуса и пересаживали на испытываемые среды.

Каллусная ткань довольно хорошо развивалась на среде без фитогормонов в среднем за месяц, увеличивая свою массу в 5 раз. На средах с ауксинами не удалось получить статистически достоверных данных ввиду значительного разброса результатов. По-видимому, уже на начальных этапах развития каллуса хмеля он имеет гетерогенную структуру, из-за чего кажущаяся однородной каллусная ткань содержит разное количество чувствительных к ауксинам клеток.

На средах с 6- БАП формировался рыхлый мелкозернистый каллус, отличавшийся быстрым ростом. С увеличением концентрации 6-БАП скорость роста каллуса увеличивалась (табл.2). Кинетин в концентрации 1 мг/л также стимулировал рост каллуса, хотя и в меньшей степени, чем 6-БАП. Повышение концентрации кинетина приводило к торможению нарастания каллусной массы это, по-видимому, связано с тем, что под действием кинетина происходило её уплотнение. Гиббереллин, добавленный в среду в концентрации 2 мг/л напротив, не оказывал никакого влияния, тогда как при увеличении его концентрации до 5 мг/л существенно инициировал рост каллуса.

Таблица 2

Увеличение каллусной массы

Фитогормон	Концентрация (мг/л)	Относительный прирост
Кинетин	1,0	7,9±07
	2,0	4,8±05
БАП	1,0	8,1±08
	2,0	11,9±09
Гиббереллин	2,0	5,9±04
	5,0	8,7±08
Без гормонов	-	5,6±06

Для инициации побегообразования мы пересаживали каллус на среды содержащие различные цитокинины в концентрации 1-2 мг/л и ИУК в концентрации 0,2 мг/л. Положительные результаты были получены на каллусе, индуцированном из тканей листа. Опыты с каллусной тканью другого происхождения давали отрицательный результат.

На средах, содержащих БАП и кинетин в концентрации 2,0 мг/л, у 40% эксплантов наблюдалось образование проэмбриогенных зон. Каллус в этих зонах отличался более крупной величиной зёрен и интенсивной зелёной окраской, однако, процесс побегообразования отмечался не чаще 1-2 случаев на 40 эксплантов. Иницированный каллус давал от 4 до 12 хорошо развитых побегов, которые при пересадке их на среду, содержащую 3,0 мг/л ИМК, легко регенерировали корни и образовывали микросаженец. Зеатин добавленный в среду, индуцировал образование побегов у каждого третьего экспланта. Но обычно это были единичные сильно утончённые побеги, отличавшиеся слабым ростом, которые не удавалось укоренить.

Трудность инициации побегообразования в каллусной ткани хмеля отмечалась и другими авторами [9,10] и требует более детального изучения, так как зависит от многих факторов в частности от возраста и типа каллусной ткани, происхождении первичного экспланта и состава среды, на которой он культивировался.

Література

1. Svoboda P. Diagnostika viro ve slechtitel'skeve materialu chmele . // Zatec.- 1994, - 23s.
2. Кормільцев Б.Ф., Бойко А.Л., Горшкова Л.Т. Використання методу культури апікальних меристем для оздоровлення хмелю від деяких вірусів.// Хмелярство, К.,- Урожай. - 1992, - 14 – с. 20-23.
3. Ashis Taru Roy, Grey Leccett, Anthony Koutoulis. Development of a shoot multiplication system for hop.// In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, - 37, - 2001, - p. 79-83.
4. Мельничук М.В., Клюваденко А.А., Давиденко О.А. Отримання безвірусного посадкового матеріалу хмелю (*Humulus lupulus* L.) в умовах in vitro // Науковий вісник Національного аграрного університету. – 2000. – 29. – С.47-52.
5. Кормільцев Б.Ф. Ефективність мікроклонального методу при розмноженні хмелю in vitro.// Хмелярство, - Просвіта,- 2006, - 23,- с. 38-44.
6. Gurriaran M.J., Revilla M.A., Tames R.S. Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cvs. Brewers Gold and Nugget.// Plant Cell Reports - 1s,- 1999, - p. 1007-1010.
7. Langezaal C.R., Scheffer J.J. Initiation and growth characterization of some hop cell suspension cultures.// Plant Cell Tiss. Organ Cult. - 30, - 1992, - p. 159-164.
8. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция // К.: - 1990. – 280 с.
9. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: - 2005. – 730 с.

Резюме

Исследованы особенности индукции каллусогенеза у тканевых сегментов стебля, листа и черешка хмеля. Установлено, что наиболее интенсивное развитие каллуса происходит на средах, которые содержат БАП и ИУК в равных концентрациях. Приведены данные исследований инициации морфогенеза в каллусной ткани хмеля.

Досліджені особливості індукції калюсогенезу у тканинних сегментів стебла, листа та черешка хмелю. Встановлено, що найбільш інтенсивний розвиток калюсу відбувається на середовищах які містять БАП та ІУК у рівних концентраціях. Приведені данні досліджень ініціації морфогенезу у калюсних тканинах хмелю.

Features of an induction callus from tissues segments of a leaves, shoots and petioles hop plant are investigated. It is established, that the most intensify generate callus mediums which contains BAP and IAA in equal concentrations. A data of researches initiation morphogenesis in callus of hop plant tissues are described.

КУЗНЕЦОВА Н.В., МИТРОФАНОВА О.В.

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, УААН,
АР Крым, г. Ялта. 98648, e-mail: in_vitro@ukr.net*

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РЕГЕНЕРАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ЧЕТЫРЕХ СОРТОВ ЧЕРЕШНИ (*PRUNUS AVIUM* L.) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Исследования в области культуры изолированных органов и тканей некоторых представителей рода *Prunus* были начаты в 70-х годах прошлого столетия [1, 6]. Однако многие проблемы клонального микроразмножения растений, относящихся к роду *Prunus*, до сих пор не решены. Трудности возникают, начиная с получения стерильной культуры первичных эксплантов, заканчивая этапами ризогенеза *in vitro* и адаптации растений – регенерантов к условиям *in vivo* [1, 3].

Одной из главных и наиболее сложных задач клонального микроразмножения является подбор питательных сред для основных этапов культивирования в условиях *in vitro*: индукции развития эксплантов, регенерации микропобегов и ризогенеза. Для каждого из них необходимы питательные среды, содержащие определенные концентрации витаминов и регуляторов роста.

Цель данной работы – выявить зависимость регенерационного потенциала органов и тканей черешни от генотипа, трофических и гормональных факторов.

Материалы и методы

В исследованиях были использованы сорта черешни (Рубиновая Ранняя, Сказка, Талисман и Анонс) разных сроков созревания плодов, произрастающие в коллекционных насаждениях степного отделения НБС-ННЦ (п. Гвардейское, АР Крым) и в опытном хозяйстве «Мелитопольское» Института орошаемого садоводства им. Н.Ф. Сидоренко (г. Мелитополь). В исследованиях применяли как общепринятые методы, так и разработанные в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [2-5]. Опыты проводились в 2006–2007 гг. В качестве первичных эксплантов были отобраны вегетативные почки и верхушечная часть активно растущих побегов. Экспланты помещали на поверхность агаризированной питательной среды в условиях ламинарного бокса Fatran Lf. Культивировали на питательных средах Gamborg и Eveleigh (B5) [7], Quoirin и Lepoivre (QL) [8], PS (в нашей модификации). Для изучения морфогенетических потенций органов и тканей в питательную среду добавляли бензиламинопурин (БАП) и гибберелловую кислоту (ГК₃). Пробирки с эксплантами