

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 633.63:631.52

ГОНТАРЕНКО С.М., кандидат біол. наук, с.н.с.,

ГЕРАСИМЕНКО Г.М., аспірант

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНДУКЦІЇ КАЛУСОГЕНЕЗУ В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

У статті представлені результати оптимізації складу живильних середовищ за вмістом макро- і мікроелементів, вуглеводів, вітамінів, амінокислот, регуляторів росту, що використовують для індукції калусогенезу в культурі пиляків цукрових буряків. Досліджено вплив різних класів регуляторів росту – ауксинів (2,4-Д), цитокінінів (6-БАП та кінетину) та АБК, амінокислот на процес індукції калусогенезу та показані шляхи отримання андрогенних калусів у культурі пиляків цукрових буряків.

Ключові слова: андрогенез, культура *in vitro*, цукрові буряки, пиляк, калус

Вступ. Склад живильних середовищ, призначених для індукції утворення морфогенних калусів в культурі ізольованих пиляків, як проміжної ланки в отриманні гаплоїдних та дигаплоїдних рослин є ключовим елементом, що обумовлює успіх в розробці методу непрямого андрогенезу.

Нині відомі методи прямого та непрямого андрогенезу, які розроблені для різних культур, у тому числі, сільськогосподарського призначення: моркви [12], томатів, капусти, цибулі [13], кукурудзи [7], картоплі [5], пшениці [3], ріпаку [4] та ін. Оскільки вимоги тканин, експлантів різних видів рослин, до джерел живлення, вітамінів і регуляторів росту суттєво різняться, авторами цих методів було оптимізовано склад живильних середовищ, який є специфічним саме для тканин пиляків та пилку цих культур [3, 4, 5, 7, 12, 13]. Слід зазначити, що не зважаючи на загальні засади створення прописів складу живильних середовищ [10], добір елементів середовищ в більшості випадків носить емпіричний характер, що не тільки ускладнює схеми дослідів та експериментальну роботу взагалі, а й впливає на результати, які в більшості випадків є досить невисокими.

Відносно цукрових буряків, відомі літературні джерела, які демонструють не тільки здатність до утворення калусу із експлантів, виділених із різних частин рослини – гіпокотилія, сім'ядоль, черешків, листків, незапліднених насінневих зачатків [2, 14], а й на високу морфогенну активність різних тканин і органів цукрових буряків [11]. Щодо андрогенних калусів пиляків цукрових буряків такі дані не відомі.

Аналіз літературних джерел та узагальнення вимог до складу живильних середовищ, призначених для індукції калусогенезу в культурі пиляків різних культур [3, 4, 5, 7, 12, 13] показали, що найбільш популярним для модифікації є середовище Мурасіге-Скуга (МС) [6, 10], яке містить збалансовану кількість живильних речовин, та Гамборга [6, 10], де загальна концентрація солей нижча, ніж в середовищі МС, але нітратного азоту більше ніж аміачного, як в оригінальному пропису, так і зміненому. Для подальшого вдосконалення використовують також середовища Дженовезі, Піріка, Ніча і Ніч та ін., що призначені для культивування пиляків злакових тютюну та індукції калусу [3, 4, 6, 10]. Загальною рисою всіх модифікованих середовищ, які використовують для індукції калусогенезу, є зниження концентрації макросолей. Їх оптимальну концентрацію також, як і мікросолей, встановлюють експериментально. В якості джерела вуглецю для більшості культур використовують сахарозу [10]. Глутамін є основною амінокислотою, яку застосовують в середовищах для калусогенезу, але останнім часом досить інтенсивно вивчається роль інших амінокислот в процесах морфогенезу [4, 7, 8].

Щодо регуляторів росту, слід зазначити, що позитивний ефект має місце переважно при використанні 2,4-Д, як основного регулятора росту, який стимулює поділ клітин і дедиференціацію тканин експланта і сприяє проліферації калусів, але в присутності одного чи двох різних цитокінінів, зокрема, 6-БАП та кінетину [9]. Є дані щодо позитивної ролі інгібітора росту АБК в ініціації калусогенезу [3, 10].

Вміст вітамінів, які є необхідними компонентами живильних середовищ, також піддавався модифікації, зокрема більшість авторів підвищували вміст тіаміну та нікотинової кислоти [10].

Мета роботи – визначити роль основних елементів та розробити склад живильних середовищ, призначених для індукції калусогенезу в культурі пиляків цукрових буряків.

Задачі досліджень:

1. Проаналізувати роль основних елементів, що входять до складу живильних середовищ призначених для індукції калусогенезу в культурі пиляків цукрових буряків.

2. Визначити дію різних класів регуляторів росту на процес індукції калусогенезу в культурі пиляків цукрових буряків.

3. Оптимізувати живильні середовища за вмістом макро- і мікроелементів; вуглеводів; вітамінів; амінокислот; регуляторів росту для індукції калусогенезу в культурі пиляків цукрових буряків.

Матеріали та методика досліджень. Досліди проводили в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України впродовж 2012-2014 рр. У дослідженнях використовували селекційний матеріал Білоцерківської та Ялтушківської ДСС – пиляки з тетраплоїдних та диплоїдних запилювачів цукрових буряків, які вирощували в умовах поля. Для роботи використовували генотипи цукрових буряків 3184K1, 3184K6, 3184K10, 3184K12, 3189K3, 3189K10, 3189K11, 3189K12, 1257K1 – K15, 1258K1 – 1258K12, 4ХММ-1 – 4ХММ-8, які залучені в селекційний процес БДСС та ін.

Стерилізацію, передобробку експлантів, інокуляцію та культивування пиляків проводили з використанням загальних схем та методів, розроблених для інших культур [7, 10], які адаптували для роботи із пиляками та пилком цукрових буряків в культурі *in vitro*. Для передобробки рослинного матеріалу (1-й етап) використовували низькотемпературний стрес – пагони з бутонами насінників цукрових буряків витримували у холодильній камері за температури 4-10⁰С, при 16-годинному освітленні 1,0-2,0 тис. люкс упродовж 7-30 діб. Для стерилізації рослинного матеріалу (2-й етап) використовували розчини етилового спирту, «Білізни», пероксид водню. Пиляки виділяли з простерилізованих бутонів та інокулювали на живильні середовища (3-й етап). Культивували в темряві за температури 26-32⁰С та відносній вологості повітря 50-70 % до проліферації калусів (4-й етап).

Для ініціації калусогенезу було розроблено і виготовлено декілька серій живильних середовищ, які різнилися за вмістом макроелементів, амінокислот, вітамінів, регуляторів росту, вуглеводів, прописи яких надані в таблиці 1.

За базове середовище брали середовище Мурасіге – Скуга [10] з повною та зменшеною у 2 рази кількістю макроелементів, з вітамінами згідно пропису Гамборга [10], з додаванням аскорбінової кислоти – 1,0 мг/л, та амінокислоти глутаміну – 500 мг/л, сахарози – 40 г/л. Модифікацію середовищ проводили за рахунок додавання до складу базового середовища таких компонентів: амінокислот – аспарагінової кислоти – 30,0-50,0 мг/л, аргініну – 2,0-250,0 мг/л, проліну – 1,0-5,0 мг/л, гідроксіпроліну, тирозину, гліцину у дозі 2,0-5,0 мг/л, регуляторів росту: 2,4-Д – 2,0 мг/л, 6-БАП – 0,6-4,0 мг/л, АБК – 0,03-0,3 мг/л, кінетину – 2,0 мг/л, НОК – 0,1-0,5 мг/л, вітамінів – аскорбінової кислоти – 5,0 мг/л, фолієвої кислоти – 0,5 мг/л. Підрахунки та спостереження в дослідах проводили з урахуванням пропозицій Сатарової [7].

В дослідах визначали: загальну кількість пиляків, що були висаджені на кожному середовищі; кількість пиляків, що виявили морфогенну активність та кількість калусів як відсоток від кількості висаджених пиляків для кожного середовища. Повторність досліду – шести-восьми разова. Статистичну обробку отриманих даних проводили використовуючи програмне забезпечення Statistika 5.1.

Результати дослідження. Результати оптимізації складу живильних середовищ для індукції калусогенезу в культурі пиляків цукрових буряків за групами компонентів: макроелементи, амінокислоти, вітаміни, регулятори росту, вуглеводи наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Склад живильних середовищ для індукції калусогенезу в культурі пиляків цукрових буряків

Компоненти середовищ	Варіанти живильних середовищ													
	СЕ	МСп	П1	П2	П3	П4	П5	П10	П11	П12	П15	П8	П9	П7
Макроелементи (МС)	1	1	1/2	1/2	1/2	1 1/2	1/2	1 1/2	1 1/2	1 1/2	1/2	1 1/2	1 1/2	1/2
Мікроелементи (МС)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Амінокислоти														
Глутамин	12,5	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Гліцин	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Аргінін	-	3,0	3,0	250	3,0	250	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Аспарагін	-	30	30	100	30	30	100	30	30	30	30	30	30	30
Пролін	-	-	-	-	-	5,0	5,0	-	-	-	-	-	-	-
Тріптофан	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Регулятори росту														
2,4-Д	-	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
6-БАП	0,1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	1,0	4,0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
АБК	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03- 0,3
Кінетін	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-
НОК	0,2	-	-	-	-	-	-	0,5	0,1	0,1	-	-	-	-
ГК	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Вітаміни														
В1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
В6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
РР	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Віт.С	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	5,0	1,0	1,0	1,0
Фолієва к-та	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-
Інші органічні домішки														
Сахароза (г)	15	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	90- 120	-	40
Мальтоза (г)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
Мезоінозит	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Агар (г)	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9

Результати досліджень показали, що майже на всіх живильних середовищах спостерігали ініціацію новоутворень – незвичайних структур у вигляді трубок (тичинкових ниток) з потовщенням на кінчиках, які розвивались із тканин центральної частини пиляка (рис. 1) та первинних калусів. Калуси були ініційовані різними тканинами – кінчиками тичинкової нитки (рис. 2) та безпосередньо тканинами пиляка (рис. 3).

Перші новоутворення з'явилися на 6-7 добу від початку культивування.

Кількість новоутворень становила 1, 63-7,70 % від кількості пиляків висаджених на модифіковані живильні середовища (табл. 2).

Кількість первинних калусів була значно меншою в порівнянні із загальною кількістю новоутворень – 0,54-1,18 % від висаджених пиляків. Найрезультативнішим для ініціації процесів калусогенезу було середовище П4, що мало в своєму складі базові регулятори росту 2,4 –Д (2,0 мг/л) і 6-БАП (0,6 мг/л), та було доповнено амінокислотою пролін (5,0 мг/л).

У більшості середовищ в якості цитокініну використовували 6-БАП (0,6 мг/л). Додавання до складу середовища кінетину (2,0 мг/л) – середовище П12, сприяло калусогенезу, а саме – утворенню калусів із тканин пиляка.

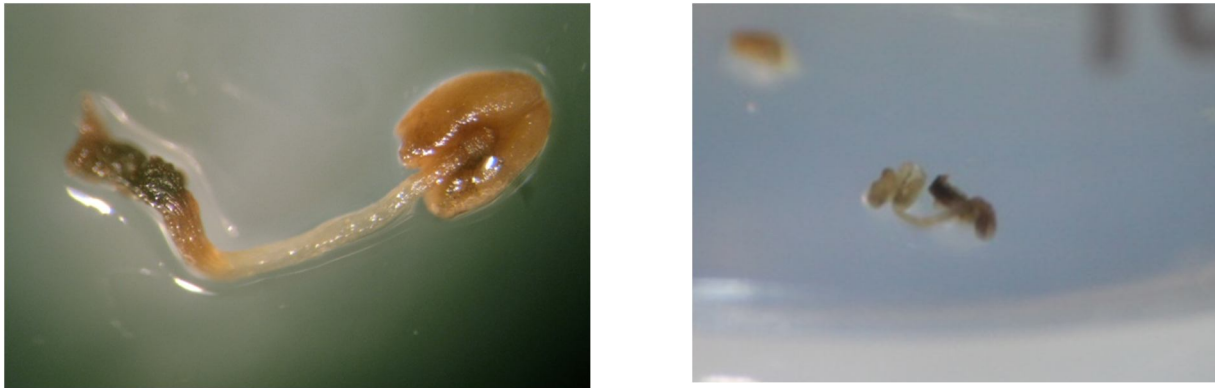


Рис. 1. Розвиток ініціюючих калусні тканини структур на кінчиках тичинкової нитки пиляків цукрових буряків



Рис. 2. Проліферація калусу із тичинкової нитки пиляка цукрових буряків

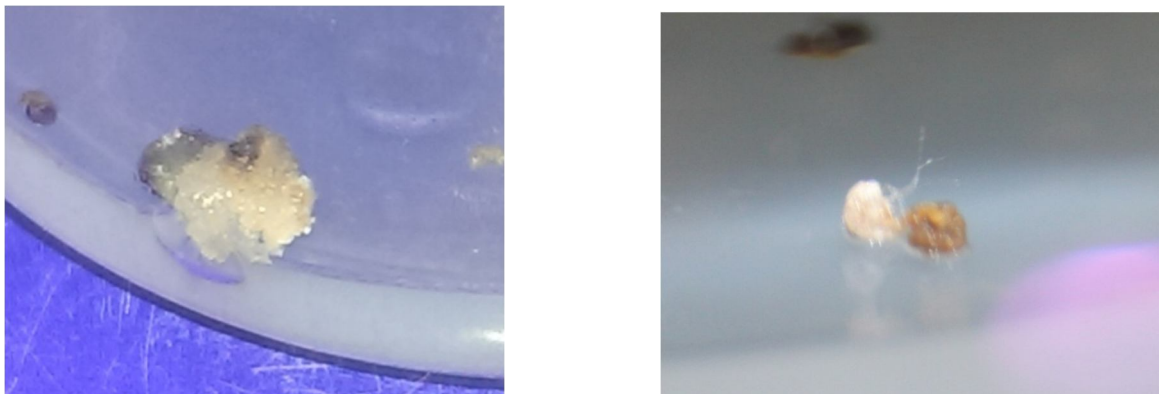


Рис. 3. Різновиди первинних калусів із пиляків цукрових буряків

Введення до складу середовищ інгібітора росту АБК (середовища П 7) у концентраціях, що рекомендовані для живильних середовищ (0,03 - 0,30 мг/л) стимулювало морфогенез. Але проліферація калусів спостерігалась тільки при культивуванні пиляків цукрових буряків на середовищах з АБК 0,3 мг/л.

Загальновідомо, що ріст ряду ізольованих рослинних тканин активується при введенні до складу середовища окремих *L*-амінокислот, найчастіше гліцину [8], або їхніх сумішей, наприклад, гідролізат казеїну [6]. Проте потреба у цих речовинах для кожного виду різна. Так, додавання в живильне середовище для культивування пиляків злакових культур проліну, оксипроліну, глютаміну збільшується частота утворення андрогенних структур [4], при додаванні проліну в 6 разів, оксипроліну більш ніж у 4 рази та глютаміну – в 5 разів.

Вплив складу живильного середовища на ініціацію новоутворень в культурі пиляків цукрових буряків

Варіанти живильних середовищ	Кількість висаджених пиляків, шт.	Кількість морфогенно - активних пиляків, %	Кількість отриманих калусів, %
СЕ	195	5,12 ± 0,41	-
МСП	257	3,50 ± 0,23	-
П1	177	7,34 ± 0,57	0,56 ± 0,27
П2	248	7,66 ± 0,63	-
П3	224	1,78 ± 0,14	-
П4	254	4,72 ± 0,37	1,18 ± 0,54
П5	245	1,63 ± 0,12	-
П7	183	7,10 ± 0,64	0,54 ± 0,21
П8	293	5,80 ± 0,48	0,68 ± 0,37
П9	116	7,70 ± 0,35	0,86 ± 0,44
П10	246	2,43 ± 0,19	-
П11	135	-	-
П12	147	4,76 ± 0,31	0,68 ± 0,31
П15	94	3,10 ± 0,23	-

У результаті проведених нами досліджень встановлено, що використання саме проліну в кількості 5 мг/л сприяло збільшенню отриманих калусів удвічі (середовище П4), тоді як збільшення дози аргініну з 3 мг/л до 250 мг/л (середовище П2) і використання триптофану (середовище П5) не вплинуло на процес калусогенезу.

Збільшення кількості сахарози з 30 г/л до 60 г/л та навіть 120 г/л в складі живильних середовищ (середовища П8) суттєво не вплинуло на кількість новоутворень. Заміна сахарози мальтозою (середовище П9) також не вплинула на кількість калусів, що утворилися, але сприяла значному збільшенню розмірів висаджених пиляків.

Виявлено, що із 43 генотипів, що вивчалися, морфогенними були майже всі, а калусогенними тільки 13. Найбільшу калусогенну активність виявилися генотипи 3184 К10, 1257 К3. Спостереження показали, що первинні калуси були переважно білого кольору або напівпрозорі, мали гомогенну структуру, але різну консистенцію – пухкі, тверді. Після перенесення колб із калусами в умови культуральної кімнати з освітленням на протязі 18 годин, калуси набували більш насиченого кольору та збільшувались у розмірах. Отримані первинні калуси були використані для подальших досліджень процесів андрогенезу в культурі *in vitro*.

Висновки. 1. Визначено дію різних класів регуляторів росту – ауксинів (2,4-Д), цитокінінів (6-БАП та кінетину) та АБК на процес індукції калусогенезу в культурі пиляків цукрових буряків. Встановлено, що позитивний ефект має місце переважно при використанні 2,4-Д, як основного регулятора росту, який сприяє проліферації калусів, але в присутності цитокінінів, зокрема, 6-БАП та кінетину. При застосуванні АБК проліферація калусів спостерігалась тільки за дози 0,3 мг/л.

2. Оптимізовано склад живильних середовищ за вмістом макро- і мікроелементів; вуглеводів; вітамінів; амінокислот; регуляторів росту для індукції калусогенезу в культурі пиляків цукрових буряків та отримані андрогенні калуси.

3. Найбільш результативнішим для ініціації процесів калусогенезу було модифіковане середовище Мурасіге-Скуга, що мало в своєму складі базові регулятори росту 2,4 –Д (2,0 мг/л) і 6-БАП (0,6 мг/л), та було доповнено амінокислотою пролін (5,0 мг/л).

Список використаних літературних джерел

1. Белинская Е.В. Влияние элементов технологии гаплоидной индукции на проявление генотипических особенностей морфогенеза в культуре пыльников *in vitro* ярового ячменя / Е.В. Белинская // Цитология и генетика. – 2010. – Т. 44. – № 2. – С. 38-44.

2. Белоус В.Е. Биотехнологические методы в селекции сахарной свеклы/ В.Е. Белоус, Н.И. Ильенко, В.И. Редько. – М.: Агропромиздат, 1989. – С. 32-41.
3. Горбунова В.Ю. Андрогенез *in vitro* у яровой мягкой пшеницы: дис... д-ра наук: 03.00.15 / В.Ю. Горбунова. – Уфа, 2000. – 290 с.
4. Ігнатова С.О. Біотехнологічні основи одержання гаплоїдів, віддалених гібридів і соматичних регенерантів зернових і бобових культур в різних системах *in vitro*: автореф.дис... д-ра наук: 03.00.20 / Ігнатова С.О. – Ялта, 2004. – 48с.
5. Маруненко И.М. Каллусогенез и эмбриогенез в культуре пыльников картофеля / И.М. Маруненко, А.А. Кучко // Цитология и генетика. – 1989. – Т. 23, № 3. – С. 48-51.
6. Мусієнко М.М. Біотехнологія рослин: навч. посібник / М.М. Мусієнко, О.О. Панюта. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2005.– 114 с.
7. Сатарова Т.Н. Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: дис. д-ра біол. наук: 03.00.20 / Т.Н. Сатарова. – К., 2002. – 537 с.
8. Сатина Т. Г. Влияние глицина на андрогенез пыльников *in vitro* ярового рапса / А.А. Муравлев. – Л., ВНИИМК, 2009. – С. 192-195.
9. Полевой В.В. Фитогормоны / В.В. Полевой. – Л.: Изд. Ленингр. ун-та, 1982. – 248 с.
10. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К., 2005. – 270 с.
11. Подвигина О.А. Теоретическое обоснование и приемы использования методов биотехнологии в селекции сахарной свеклы : дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.05 / О.А. Подвигина. – Воронеж, 2003. – 280 с.
12. Тюкавин Г.Б. Биотехнологические основы селекционной технологии моркови: *Daucus carota* L.: дис... д-ра биол. наук: 03.00.23 / Г.Б. Тюкавин. – М., 2007. – 539 с.
13. Шмыкова Н.А. Разработка системы биотехнологических методов, направленных на ускорение селекционного процесса овощных культур: дис. ..д-ра. биол. наук: 03.00.23 / Н.А. Шмыкова. – М., 2006. – 365 с.
14. Sanders J.W. Shoot regeneration from hormone-autonomous callus and adventitious buds in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / J.W. Sanders // Plant Sci. Lett. – 1984. – 34. – P. 219-223.

Аннотация

Гонтаренко С.М., Герасименко Г.М.

Питательные среды для индукции калусогенезу в культуре пыльников сахарной свеклы

В статье представлены результаты оптимизации состава питательных сред по содержанию макро- и микроэлементов, углеводов, витаминов, аминокислот, регуляторов роста для индукции калусогенеза в культуре пыльников сахарной свеклы. Исследовано влияние разных классов регуляторов роста – ауксинов (2,4-Д), цитокининов (6-БАП, кинетин) и АБК, аминокислот на процесс индукции калусогенеза и показаны пути получения андрогенных каллусов в культуре пыльников сахарной свеклы.

Ключевые слова: андрогенез, культура *in vitro*, сахарная свекла, пыльник, каллус

Annotation

Gontarenko S., Gerasimenko G.

The composition of culture medias for induction of callusogenesis in the anther culture of sugar beet

In the article the results on optimization of composition culture medias are presented on macro-and microelements, carbohydrates, vitamins, amino acids, plant grows regulators callus for induction of callusogenesis in the anther culture of sugar beet. Influence of different classes of plant grows regulators is investigate – ауксинов (2,4-D), cytokinin (6-BAP and kinetin.) and ABA, aminoacids on the process of induction of callusogenesis and the ways of propagatins of androgenic calluses are shown in the anther culture of sugar beet.

Keywords: androgenesis, culture *in vitro*, sugar beets, anther, callus

Отримано редакцією – 13.05.2014 р.