

УДК [581.1443.6+582.852.2]

В. Маляренко, студ., А.Голубенко, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ**ІНІЦІАЦІЯ КАЛЮСОГЕНЕЗУ *IN VITRO* У ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ САСТАСЕАЕ**

Метою нашого дослідження було підібрати оптимальні живильні середовища для ініціювання калюсогенезу у представників родини *Sactaceae*. У роботі застосовували загальноприйняті методи біотехнології рослин. Первинні експланти кактусів культивували на живильному середовищі Мурашіге і Скуга (МС) з розведеним удвічі вмістом макро- і мікроелементів, доповненому вітамінами (В₆ – 0,5 мг/л, РР – 1 мг/л), мезоінозитом (100 мг/л) і сахарозою (20 г/л). Встановлено, що утворення первинного калюсу було ефективним при культивуванні експлантів на агаризованому живильному середовищі ½ МС з додаванням 20 г/л сахарози, у поєднанні з 3 мг/л 6-бензиламінопурину, 0,2 мг/л індоп-3-оцтової кислоти, 0,1 мг/л α-нафтилоцтової кислоти та вітаміну С (5 мг/л). Виявлено, що для ініціації диференціації тканин та калюсогенезу кактусів необхідні високі концентрації цитокінін-активних регуляторів росту.

Ключові слова: *Cereus peruvianus*, *in vitro*, калюс.

Вступ. Відтворення рослин за допомогою біотехнологічних методів шляхом стимулювання калюсогенезу в умовах *in vitro* використовується у двох напрямках: селекції рослин для полегшення і прискорення селекційного процесу та створення генетичного різноманіття і скринінгу генотипів із важливими характеристиками. Перший етап полягає у заплідненні рослин *in vitro*, культивуванні незрілих гібридних бруньок і зародків, регенерації рослин із тканин летальних гібридів, мікроклонального розмноження нових сортів, гібридів і ліній, кріозбереження генофонду. У генній інженерії застосовується для використання соматичних варіацій і отримання індукованих мутантів на клітинному рівні, гібридизації соматичних клітин, перенесення чужорідних цитоплазматичних генів і генетичної інформації різного походження та у клітинній селекції [1].

Калюсні культури використовуються для досліджень, які потребують довготривалого культивування *in vitro*. У калюсі реалізується тотипотентність клітин, зберігається їхня генетична гетерогенність та генетичні особливості виду і деякі епігенетичні особливості [1]. З калюсу здатні диференціюватися як спеціалізовані клітини, які виконують специфічні функції, так і різні типи тканин. Також для індукції формування окремих органів рослин: коренів, пагонів, репродуктивних органів. Для відтворення генотипу вихідної рослини ефективніше використовувати соматичні ембріоїди, не витрачається час і регулятори росту на індукцію ризогенезу [1; 2].

Методи мікроклонального розмноження рослин мають ряд переваг, одна з них у тому, що розмноження рослини займає короткий цикл протягом року, незалежно від пори року, і, в результаті, може бути отримане логарифмічне збільшення кількості рослин [3; 4].

Усі представники родини *Sactaceae* мають САМ-тип метаболізму, що характеризується ізольованістю рослин від оточуючого середовища вдень і обміном кисню, вуглекислим газом та випаровуванням води уночі [5]. Такий тип метаболізму дозволяє рослинам економно використовувати воду, не знижуючи суттєво активність фотосинтезу. З іншого боку, газообмін у цих рослин ускладнений і в рослині накопичується незначна кількість поживних речовин, внаслідок чого спостерігається їхній повільний ріст [5]. Так, *Carnegie gigantea* в природних умовах має середній річний приріст стебла у висоту 2-3 см, а *Echinocactus grusonii* – 5 мм [5]. Наприклад, у *Rebutia fiebrigii* (Gürke) Britton & Rose in L.H.Bailey & L.H.Bailey лише у віці 8-10 років утворюються, бічні пагони, які можна використовувати для вегетативного розмноження.

У межах дослідження особливостей морфогенезу рослин кактусів *in vitro* ми вивчали здатність до калюсогенезу представників родини, яким властиві повільні темпи росту. Метою нашого дослідження було отримати калюс як первинний матеріал для оптимізації живильних середовищ, спрямованих на отримання макси-

мального приросту калюсу, процесів регенерації та, у майбутньому, вивчення вторинних метаболітів.

Матеріали та методи. Із колекції сукулентних рослин захищеного ґрунту Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна для дослідів були відібрані види *Cereus peruvianus* (L.) Mill. f. *monstrosa* і *Mammillaria elongata* A.P. de Candolle f. *cristata* в регенеративному періоді розвитку та насіння видів *Setiechinopsis mirabilis* (Speg.) Backeb. і *Aylostera fibrigii* (Gürke) Backeb.

Об'єктами досліджень були стебла *C. peruvianus* і *M. elongata*; сіянці *S. mirabilis* і *A. fibrigii*. Первинними експлантами були апікальні, латеральні, базальні сегменти багаторічних та дворічних стебел *C. peruvianus* і *M. elongata* та сіянці *S. mirabilis* і *A. fibrigii*, які були вирощені в асептичних умовах.

Для поверхневої стерилізації стебел застосовували загальноприйняті методи у власних модифікаціях [2; 3]. Всі експланти культивувалися на базовому живильному середовищі Мурашіге-Скуга (МС) [6] з розведеним удвічі вмістом мінеральних макро- та мікроелементів (½ МС). рН середовищ доводилось до 5,5-5,8 за допомогою КОН перед додаванням агар-агару (8 г/л). Також додавали вітаміни (В₁ та В₆ – по 0,5 мг/л, РР – 1 мг/л, С – 10 мг/л) та 20 г/л сахарози, середовища доповнювали комбінаціями різних концентрацій 6-бензиламінопурину (БАП), індолилоцтової кислоти (ІОК), нафтилоцтової кислоти (НОК). Експланти інкубували при 25 °С і 16-годинному фотоперіоді.

Результати та обговорення. У результаті введення рослинного матеріалу в культуру *in vitro* виявлено, що стерилізація частин пагонів була успішною для *C. peruvianus* f. *monstrosa* при експозиції в 70%-му розчині етанолу впродовж 8 хв., у 0,1%-му розчині хлориду ртуті протягом 7-8 хв. У дистильованій воді промивали тричі по 5 хв.

Для *M. elongata* необхідна нижча, порівняно з *C. peruvianus* – тривалість експозиції в 70%-му етанолі – 20 с, у 0,1%-му розчині хлориду ртуті не довше 7 хв. Також, попереднє видалення колючок з ареол, рекомендоване в літературних джерелах, не підвищувало ефективності стерилізації [7]. Експланти піддавались токсичній дії стерилізуючої речовини саме через пошкоджені покривні тканини, що унеможливило його розвиток.

Насіння *S. mirabilis* і *A. fibrigii* вводились в культуру в період з грудня по березень місяць. Стерилізацію вихідного матеріалу здійснювали в 70%-му розчині етанолу тривалістю 1 хв, у 0,1%-му розчині хлориду ртуті – 15хв, промивали в дистильованій воді тричі по 5 хв.

Двомісячні сіянці *A. fibrigii* та *S. mirabilis*, які проросли з насіння в асептичних умовах на середовищі ½ МС переносилили на живильні середовища з регуляторами росту. Сіянці обох видів культивувались на живильному середовищі ½ МС з додаванням 1 мг/л БАП, 0,2 мг/л ІОК і 0,1 мг/л НОК. Формування калюсу (рис. 1, 2) спостерігалось на 20-й тиждень культивування. У Центра-

льному Ботанічному саду НАН Білорусі проводились дослідження з виявлення особливостей калюсогенезу видів *Ayrostrocyndropuntia subulata* (Münchhpfdrdt.) Backbg, *Chamecereus silvestrii* cv. *variegata* (Speg.) Br. Et R., *Dolichothele longimamma* (DC.) Britton & Rose, *Opuntia salmiana* J.Parm. ex Pfeiff. Була виявлена висока інтенсивність калюсогенезу на живильному середовищі MS з додаванням 2 мг/л або 3 мг/л ІОК, та при поєднанні різних концентрацій цитокінінів і ауксинів [8].

При культивуванні апікальних експлантів *M. elongata* на середовищі з 1,25 мг/л БАП у комбінації з 0,2 мг/л НОК і 0,1 мг/л ІОК з ареол було ініційоване утворення первинного калюсу на шостий тиждень (рис. 3). Після пасажування експлантів на живильне середовище, яке містило 3 мг/л БАП, 0,5 мг/л НОК з додаванням 10 мг/л аскорбінової кислоти, інтенсивне формування калюсу було зафіксоване на третій тиждень культивування. Також у експлантів вдалося уникнути появи некрозів. У результаті експериментів первинний калюс було отримано з сосочків із частиною тканин стебла для *M. elongata* при культивуванні на живильному середовищі MS що містить комбінації цитокінінів і ауксинів у концентраціях: 2,4 мг/л, 5 мг/л, 10 мг/л БАП і 0,2 мг/л, 1 мг/л або 5 мг/л НОК, відповідно [10]. Так, апікальні, базальні, латеральні експланти, отримані з тримісячних сіянців *M. mathildae*, вирощених *in vitro*, культивувались на живильному середовищі MS, доповненому цитокінінами і ауксинами у концентраціях 0,6 мг/л БАП і 3,8 мг/л ІОК. Активний калюсогенез було відмічено на 60 добу культивування [9].

На базальних і латеральних експлантах, отриманих з багаторічних стебел *C. peruvianus* f. *monstrosa* формування первинного калюсу спостерігалось через чотири тижні культивування на живильному середовищі $\frac{1}{2}$ MS з додаванням регуляторів росту в концентраціях 1,5 мг/л БАП і 0,25 мг/л НОК. Під час культивування експланти сильно окислювались, виділяючи в живильне середовище фенольні речовини, які інгібували розвиток калюсу. Тому для наступних дослідів були використані експланти з молодших (дворічних) стебел. Культивування проводили на $\frac{1}{2}$ MS, концентрація фітогормонів була 4 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК. В результаті використання молодшого вихідного матеріалу і підвищення концентрації цитокінінів та ауксинів ініціація калюсогенезу спостерігалася вже через 10 днів, а окислення експлантів і виділення фенольних речовин вдалося уникнути. Для ініціації утворення калюсу у дослідів із застосуванням 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) і кінетину в живильному середовищі MS було відмічено калюсогенез через 12 тижнів. Так, в результаті комбінацій 4 мг/л 2,4-Д і 4 мг/л або 6 мг/л кінетину вдалося індукувати утворення рихлого калюсу [10]. Отже, нами було ініційовано калюсогенез *C. peruvianus* f. *monstrosa* (рис. 4) за меншої концентрації та іншого поєднання фітогормонів та встановлено можливість культивування експлантів досліджуваного виду на живильному середовищі MS з розведеною удвічі концентрацією мікро-і макросолей.



Рис.1. Калюсогенез у *Aylosteria fibrigii*



Рис.2. Калюсогенез у *Setiechinopsis mirabilis*

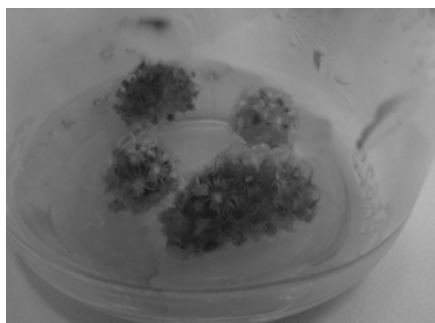


Рис. 3. Калюсогенез у *Mammillaria elongata* f. *cristata*



Рис.4. Калюсогенез у *Cereus peruvianus* f. *monstrosa*

Висновки. У результаті досліджень були підібрані живильні середовища для ініціації калюсогенезу. Формування первинного калюсу досліджуваних видів відбувається на середовищах $\frac{1}{2}$ MS з додаванням регуляторів росту в поєднаннях концентрацій: 1 мг/л БАП, 0,2 мг/л ІОК і 0,1 мг/л НОК; 4 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК; 3 мг/л БАП і 0,5 мг/л НОК.

Встановлено, що для ефективного введення в культуру *in vitro* та подальшого культивування їх на живильних середовищах для ініціації різних типів морфогенезу необхідно використовувати молоді 1-2-річні стебла у

якості первинного культиваційного матеріалу, оскільки у багаторічних стеблах *Cereus peruvianus* f. *monstrosa* синтезуються фенольні речовини, які інгібують ріст і розвиток експлантів.

Отриманий первинний калюс є експериментальним матеріалом для оптимізації живильних середовищ для проліферації калюсу та регенерації.

Список використаної літератури

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М., 1999.

2. Черевченко Т.М., Лаврентьевна А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. – К.: Наукова Думка, 2007.
3. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. – К.: Наукова думка, 2005.
4. Gonzalez M., Serpa, M. Micropropagation de *Nephrolepis exaltat* L. Hort. Science. 1992;27(6):697.
5. Тахтаджян А.Л. Жизнь растений: Т.5, ч. 1. – М.: "Просвещение". 1981.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962;15:473-497.
7. Papafiotou M., Balotis G., Louka P., Chronopoulos J. In vitro plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2001;65:163–7.
8. Сорока А.В., Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И. Влияние генотипа на размножение представителей семейства *Cactaceae* в культуре *in vitro*. Тез. 3-ей международной научной конференции "Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии, Минск, 2008. 549 с.
9. Garcia-Rubio, Malda-Barrera G. Micropropagation and Reintroduction of the Endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to Its Natural Habitat. Hort. Science. 2010;45(6):934–8.
10. S. A. de Oliveira, M. de F. Pires da Silva Machado, A. J. Prioli. In vitro propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). In Vitro Cell Dev Biol – Plant. 1995;31(1):47-50.doi: 10.1007/BF02632226.

References

1. Butenko R.G. Biologiy kletok vusshih rasteniy in vitro I biotekhnologii na ih osnove. – M., 1999.
2. Cherevchenko T.M., Lavrentevna A.N., Ivannikov R.V. Biotechnologiy tropicheskikh I subtropicheskikh rasteniy in vitro. K.:Naukova dumka, 2007.
3. Kushnir G.P. Sarnacka V.V. Mikroklonalne rozmnozheniay roslin.- K.; Naukova dumka, 2005.
4. Gonzalez M., Serpa, M. Micropropagation de *Nephrolepis exaltat* L. Hort. Science. 1992;27(6):697.
5. Tahtadzhayn A.L. Zhizn rasteniy:T.5. №1. – M.: Prosveschenie. 1981.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962;15:473-497.
7. Papafiotou M., Balotis G., Louka P., Chronopoulos J. In vitro plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2001;65:163–7.
8. Soroka A.V., Berdichevac L.G., Fomenko T.I. Vliaynie genotipa na rozmnozhenie predstaviteley semeystva *Cactaceae* v kul'type *in vitro*. Tezu III Mezhdunarodnoy nauchnoy konferencii "Teoreticheskie I prikladnye aspektu biochimii I biotekhnologii, Minsk, 2008.549 p.
9. Garcia-Rubio, Malda-Barrera G. Micropropagation and Reintroduction of the Endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to Its Natural Habitat. Hort. Science. 2010;45(6):934–8.
10. S. A. de Oliveira, M. de F. Pires da Silva Machado, A. J. Prioli. In vitro propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). In Vitro Cell Dev Biol – Plant. 1995;31(1):47-50.doi: 10.1007/BF02632226.

Надійшла до редколегії 10.04.17

В. Маляренко, студ., А. Голубенко, канд. биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка Київ, Україна

ИНИЦИАЦИЯ КАЛЛУСОГЕНЕЗА IN VITRO У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА САСТАСЕАЕ

Целью нашего исследования было подобрать оптимальные питательные среды для инициирования каллусогенеза у некоторых представителей семейства *Cactaceae*. В работе использовали общепринятые методы биотехнологии растений. Первичные экспланты кактусов культивировали на питательной среде Мурашиге и Скуга (МС) с разведенным в два раза содержанием макро- и микроэлементов дополненной витаминами (B6 – 0.5 мг/л, PP – 1 мг/л), мезоинозитом (100 мг/л) и сахарозой (20 г/л). Установлено, что образования первичного каллуса было эффективным при культивировании эксплантов на агаризованной питательной среде с добавлением ½ МС с добавлением 20 г/л сахарозы, в сочетании с 3 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,2 мг/л индол-3-уксусной кислоты, 0,1 мг/л α-нафтилуксусной кислоты и витамина С. Выявлено, что для инициации дедифференциации и каллусогенеза необходимы высокие концентрации цитокининактивных регуляторов роста.

Ключевые слова: *Cereus peruvianus*, *in vitro*, каллус.

V. Maliarenko stud., A. Golubenko PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CALLUS INDUCTION IN VITRO OF CACTACEAE FAMILY

Our research goal has been to find the optimal nutrient media for initiation of the primary callus in the species of the *Cactaceae* family. Common methods of plant biotechnology were used. Primary explants of the cacti were cultivated on Murashige and Skoog medium (MS medium). The content of macro- and microelements has been diluted twice (½ MS) and the vitamins (B1 and B6 – 0.5 mg/l, PP – 1 mg/l) were added, as well as 100 mg/l meso-inositol and 20 g/l of sucrose. It was determined that callus formation formed efficiently when cultivated on half MS media with 20 g/l sucrose, 3 mg/l 6-benzylaminopurine, 0.2 mg/l indole-3-acetic acid, 0.1 mg/l α-naphthaleneacetic acid and 5 mg/l ascorbic acid. It was discovered, that for initiation of tissue differentiation and cacti callus formation, high concentrations of cytokinin-active growth regulators are required.

Key words: *Cereus peruvianus*, *in vitro*, callus.

УДК 578.863.1:578.083.24:578.083.33

О. Кучерявенко, асп., О. Пиріг, канд. с/г наук, Т. Бова, канд. біол. наук
Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, Київ,
О. Тимошенко, канд с/г наук
Чернігівський національний технологічний університет, Чернігів,
І. Будзанівська, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

КОНСТРУЮВАННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МВК У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

У результаті проведеної роботи отримано специфічні компоненти, які дозволяють сконструювати вітчизняну імуноферментну тест-систему для виявлення МВК, яка є невід'ємною складовою ефективного контролю насінневого матеріалу картоплі на всіх етапах вирощування.

Ключові слова: М-вірус картоплі, антиген, рослини-індикатори, діагностична антисироватка, кон'югат, імуноферментна тест-система.

Вступ. Вірусні хвороби є причиною виродження сортів картоплі, і саме вони є об'єктом найпильнішої уваги картоплярів у світі. Одним з найпоширеніших та шкочинних вірусних патогенів в агроценозах з картоплею є М-вірус картоплі (*Potato virus M*, рід *Carlavirus*, родина *Betaflexiviridae*). За багаторічними даними співробітників лабораторії вірусології Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва

НААН (ІСМАВ НААН) МВК спостерігається як у моноінфекції (36 % досліджуваних зразків), так і у комплексі з іншими мозаїчними вірусами (до 99 %). Крім того, у 20–70 % виявлено безсимптомний перебіг вірусного захворювання [1 – 5]. Тобто вже при вирощуванні насінневого матеріалу складаються передумови економічних збитків у галузі картоплярства. Втрати врожаю від М-вірусної інфекції можуть сягати 41 % [6–8]. Захист рос-