

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

використовували протокорми після 3 – 4 тижнів культивування (рахуючи від останньої пересадки).

Для виділення протопластів використовували асептичні протокорми. Їх нарізали на шматочки розміром близько 1 – 2 мм. Рослинний матеріал поміщали у чашки Петрі (90×15 мм) на поверхню ферментного розчину об'ємом 5 мл. Для підбору умов ферментації випробовували чотири різних ферментні суміші, приготованих на 0,4 М сахарозі (табл. 2). Ферментний розчин стерилізували фільтруванням. Ферментація тканин проходила протягом 16-18 годин. Обробка ферментами відбувалась в темряві при температурі 23°C. Очистку протопластів від клітинного дебрису проводили методом флотації в 0,4 М сахарозі, з подальшим подвійним відмиванням у сольовому середовищі W5 [10]. Для цього отриману після інкубації ферментну суміш з суспензією протопластів фільтрували через нейлонову сітку і переносили по 6 мл у центрифужні пробірки об'ємом 10 мл. На суспензію протопластів обережно нашаровували по 1 мл сольового розчину W5 і центрифугували при 100g 5 хв. Життєздатні протопласти, що збиралися в інтерфазі, обережно збирали пастерівською піпеткою разом з W5 і переносили в чисту пробірку. Далі до них додавали 6 мл W5, ресуспендували і осаджували при 80g 1 хв. Надосадову рідину видаляли, а осад повторно суспендували і центрифугували при тих самих умовах. Кількість виділених протопластів підраховували у камері Горяєва.

Для культивування протопластів фаленопсису з них рослин використовували середовища WSS, KM8p, SW1 [10]. Протопласти ресуспендували у середовищах у концентрації 3×10^5 протопластів у 1 мл середовища.

Таблиця 1

Склад живильних середовищ, використаних при культивуванні протокормів та регенерації з них рослин, мг/л

<i>Компонент</i>	Orc	OrcR
KNO ₃	1900	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
NH ₄ Cl	267,5	267,5
Мікросолі	MS	MS
Fe-хелат	MS	MS
Міоїнозит	200	200
PP	1	1
B ₁	10	10
B ₆	1	1
БАП	-	1
НОК	-	0,1
Гліцин	2	2
Гідролізат казеїну	2000	2000
Сахароза	20000	20000
Агар	6000	6000
Гумат натрію	50	50
Пептон	2000	2000
Активоване вугілля	1000	1000
МЕС	500	500
pH	5,7	5,7

Таблиця 2

Склад ферментних сумішей використаних при ферментації протокормів фаленопсису

Фермент	Варіанти ферментних розчинів, концентрація в %			
	1	2	3	4
Cellulase	-	0,5	-	-
Cellulase RS	-	-	2	-
Cellulysin	1	-	-	0,2
Macerase	0,1	0,5	-	-
Macerozyme	-	-	-	0,5
Onozuka	-	-	-	0,5
Pectolyase	-	-	0,1	-

Протопласти культивували в темряві при 25°C протягом 7 діб. Після перших поділів до суспензії протопластів додавали рівний об'єм середовища SW1. В подальшому клітини культивували на розсіяному світлі в умовах термальної. Середовище SW1 використовували і надалі для розведення культури протопластів.

Результати та обговорення

Кількість повідомлень про культуру протопластів фаленопсису обмежена [3, 5 – 8]. Існує 4 повідомлення про отримання колоній з протопластів [5 – 8], із них лише 2 про регенерацію рослин у *Phalaenopsis* [6, 8]. Джерелом протопластів були калусні культури, використання яких має певні недоліки. Нами як джерело для виділення протопластів були використані отримані з насіння асептичні протокорми. Досліджували чотири варіанти ферментних розчинів, які містили целюлази (Cellulase, Cellulase RS, Cellulysin, Onozuka) та пектинази (Macerase, Macerozyme, Pectolyase) різного походження та в різних концентраціях. Сумарна концентрація ферментів змінювалась від 1,0% до 2,1%. Проте, на ефективність виділення протопластів впливала не тільки сумарна концентрація, але й якісний склад. Ефективність ферментації більше залежала від якісного складу, ніж від кількісного. З чотирьох випробуваних ферментів найбільший вихід протопластів давав фермент №1, який містив 1% Cellulysin та 0,1% Macerase, вихід протопластів становив близько $1-1,5 \cdot 10^6$ протопластів з 1 г ферментованих протокормів. Ферментна суміш №3 виявилась зовсім неефективною, оскільки протопласти з ферментованих тканини не виділялись. Суміш мала найвищу сумарну концентрацію ферментів (2,1%). Результат виявився несподіваним, оскільки ця ферментна суміш ефективно використовувалась для виділення протопластів іншої родини однодольних (злаків). Ферментні суміші №2 і №4 дозволяли виділити незначну кількість протопластів, при цьому ферментна суміш №4 (виділялось близько $0,5-0,7 \cdot 10^6$ протопластів/г) була кращою за №2 ($0,2-0,3 \cdot 10^6$ протопластів/г). Можна припустити, що саме присутність Cellulysin була необхідною для успішної ферментації протокормів фаленопсису.

Після виділення протопласти висівали на різні живильні середовища: SW1, KM8p, WSS. Поділи спостерігали виключно на середовищі SW1. На інших двох середовищах протопласти гинули через 4-7 днів. На середовищі SW1 на третій день після висіву спостерігали брунькування клітин, а на сьомий – перші поділи (рис.1). Колонії утворювались через 14 – 21 день. Запропонована нами методика не потребує попереднього створення високорегенераційних калусних ліній як джерела протопластів [6, 8], наявності важкодоступних компонентів середовища, таких як кокосове молоко [6, 7] або заправлення протопластів у альгінат [8].

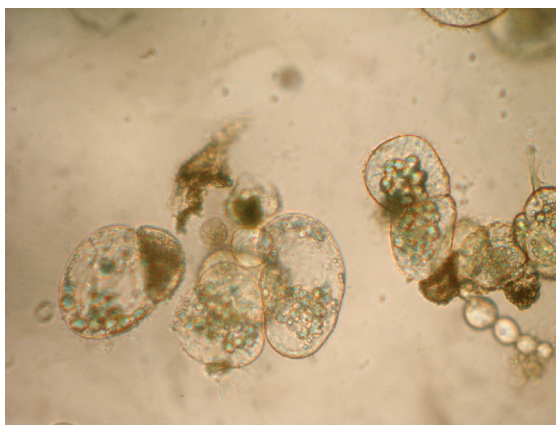


Рис.1. Брунькування та перші поділи протопластів.

Утворені колонії переносили на тверде регенераційне середовище OrcR через 3 місяці. Процес регенерації рослин з отриманих колоній потребує подальшої оптимізації.

Висновки Асептичні протокорми фаленопсису придатні для виділення протопластів за допомогою ферментного розчину (1% Cellulisin та 0,1% Macerase). Успішне утворення колоній отримане на середовищі SW1.

Література

1. Червченко Т.М. Тропические и субтропические орхидеи // К.: Наук. думка. – 1993. – 254 с.
2. Teo C.K.H., Neumann K.H. The culture of protoplasts isolated from *Renantanda Rosalind Cheok* (J). // *Orchid Rev* . - 1978. - vol.86. – P. 156–158
3. Teo C.K.H., Neumann K.H. The isolation and hybridization of protoplasts from orchids. // *Orchid Rev* . - 1978. - vol.86. – P.186–189
4. Price G.R., Earle E.D. Sources of orchid protoplasts for fusion experiments. // *Amer Orchid Soc Bull* . – 1984. – vol. 53. - P. 1035–1043
5. Sajise J., Valmajor H. L., Sagava Y. Some problems in isolation and culture of orchid protoplasts. *Proceedings of the Nagoya International Orchid Show (NIOS), 1990.* – P.84 – 89.
6. Kobayashi S., Kameya T., Ichihashi S. Plant regeneration from protoplasts derived from callus of *Phalaenopsis* // *Plant Tissue Culture Lett.* – 1993. - vol. 10. - P. 267 – 270.
7. Ichihashi S., Shigemura S. *Phalaenopsis* callus and protoplast culture. // *Proceedings of the 17th World Orchid conference, Malaysia, 2002.* – P.257 – 261.
8. Shrestha B. R., Tokuhara K., Mii M. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Phalaenopsis* // *Plant Cell Rep.* – 2007. - vol. 26. - P. 719 – 725.
9. Рельке Ф. Орхидеи. - М.: Лик пресс. – 1998. – 63 с.
10. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. — Киев: Наук.Думка, 1985. – 130 с.

Резюме

Подобран состав раствора для ферментации протокормов фаленопсиса (1% Cellulisin и 0,1% Macerase) и выделены протопласты в количестве достаточном для культивирования. Разработаны условия получения колоний из протопластов на среде SW1.

Підібрано склад розчину для ферментації протокормів фаленопсису (1% Cellulisin та 0,1% Macerase) і виділено протопласти в достатній для культивування кількості. Розроблено умови отримання колоній з протопластів на середовищі SW1.

Enzyme solution containing 1% Cellulisin and 0,1% Macerase was selected for protoplast isolation from protocorm-like bodies of *Phalaenopsis*. Successful colony formation from isolated protoplasts was observed on SW1 medium.