

інородної ДНК призводить до пошкоджень в клітині-господаря, ступінь виживання рослинної тканини при трансформації селективній дії середовища знижується.

Agrobacterial transformation by means of high-virulent strain *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 carrying genetic construction GFP-TUA1 was carried out by the co-cultivation method of hypocotyl explants from 4 fiber flax cultivars (Dashkovsky, Niva, Mogilevsky, Pramen) and 2 accessions presented for State variety tests (Levit-1, Belita). The necessity for preliminary assessment of the morphogenetic potential and regenerative ability of genotypes is shown since penetration of alien DNA results in damages in host cell and the degree of plant cell survival under transformation and selective environmental influence is reduced.

ЗАДОРЖНА О.А., ЮШКІНА Л.Л.

Інститут рослинництва ім.В.Я.Юр'єва УААН

Україна, 61060, Харків, Московський пр., 142, e-mail: olzador@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ ГОРОХУ (*PISUM SATIVUM L.*) ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ *IN VITRO*

Сучасний стан біологічної науки потребує вирішення багатьох проблем в умовах *in vitro*. В цих умовах можливо створення моделей прискореного вивчення реакції певних генотипів на біотичні та абіотичні стреси [1, 2], створення селективних середовищ, проведення процесів трансформації [3], мікроклонального розмноження та вивчення багатьох інших питань.

Така важлива сільськогосподарська культура як горох посівний (*Pisum sativum L.*), має відомі труднощі при культивуванні *in vitro* [3, 4], тому при розробці відповідних методик культивування, крім певного складу живильних середовищ необхідно використовувати генотипи, які легше переносять необхідні етапи культивування.

Метою нашої роботи було дослідження калюсогенезу, утворення пагонів та ризогенезу 10 генотипів гороху на різних живильних середовищах та з'ясування вирішального впливу факторів генотипу та живильного середовища на ці формотворчі процеси.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були експланти 10 сортів гороху (таб.1), які культивувалися на чотирьох живильних середовищах. В якості експлантів використовували гіпокотилі, епикотилі, апікальну меристему та меристему сім'ядольного вузла, які одержували з паростків гороху, що вирощували в асептичних умовах на живильному середовищі, що містило 50% макро-, мікросолей та вітамінів В5 [5], 1 г/л сахарози, 8 г/л агару. Для індукції калюсогенезу використовували такі живильні середовища: I - макросолі MS [6], 4 x мікросолі MS, вітаміни В5, з додаванням 1 мг/л НОК (нафтилоцтова кислота), 5 мг/л БАП (6-бензиламінопурин) [7]; II - мінеральні солі та вітаміни В5 з додаванням 2 мг/л БАП, 5 мг/л НОК [8]; III – мінеральні солі та вітаміни В5 з додаванням 0,8 г/л NH₄NO₃, 1 мг/л БАП, 1 мг/л НОК [9]; IV - мінеральні солі MS, вітаміни В5 з додаванням 12 мг/л БАП [9]. Всі середовища вміщували 30 г/л сахарози, 8 г/л агару. Утворені пагони пересаджували на середовище для дорощування, що містили мінеральні солі та вітаміни В5 з додаванням 2 мг/л гібереліну [7]. Далі пагони пересаджували на середовище для укорінення, що містило мінеральні солі та вітаміни MS та 2 мг/л НОК [10]. Культивування *in vitro* проводили при освітленні 4000 лк, світловому періоді 16 годин на добу та температурі 24±2⁰С.

В процесі досліджування обчислювались такі показники: інтенсивність калюсогенезу (за кількістю експлантів, що утворили калюс), інтенсивність морфогенезу (за кількістю експлантів, на яких утворились пагони), “пагоногенез” (за кількістю пагонів на експланті). Інтенсивність ризогенезу обліковували за кількістю пагонів на яких утворювались корінці. Аналіз показників калюсо- та морфогенезу проводився за допомогою методів варіаційної статистики [11].

Результати та обговорення

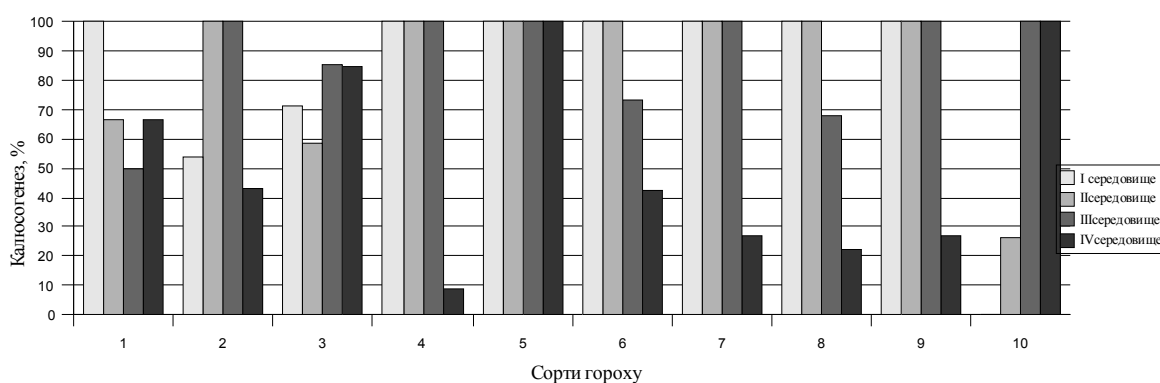
Відомо, що здатність до калюсогенезу характеризується високою усадкованістю [12]. Ця ознака у більшості випадків контролюється генами з адитивним ефектом [13], часто спостерігається гетерозисний ефект [14]. Дані деяких дослідників свідчать, що здатність до калюсоутворення та темп росту калюсів визначається моногенно [15,16], причому, домінантні алелі пригнічують його ріст, а рецесивні – стимулюють [16]. За даними деяких авторів ця ознака контролюється генами як ядра, так і цитоплазми [17]. Залежність інтенсивності калюсогенезу від генотипу свідчить про наявність генів, які впливають на метаболізм фітогормонів. Попередні дослідження інших авторів доводять, що баланс ендогенних фітогормонів істотно впливає на первинний калюсогенез [15]. Так, при вирощуванні експлантів пшениці з різним відомим вмістом фітогормонів знайдено різницю за частотою морфогенезу та регенераційною здатністю [18].

Таблиця 1

Сорти гороху, що культивувались *in vitro*

№ п/п	Назва сорту	№ Націон. каталогу	Країна походження	Калюсогенез, %	Морфогенез, %	Пагоногенез шт	Ризогенез, %
1	Норд	UD0100434	Росія	70,8	27,6	3,5	90
2	Зубр	UD0100193	Росія	74,2	36,3	2,5	70
3	Совершенство	UD0101375	Росія	74,9	27,7	2,1	90
4	Розоцветущая	UD0101377	Росія	77,2	15,5	2,5	36,7
5	Малиновка	UD0101726	Росія	100	17,7	1,3	10
6	Dunav	UD0102062	Серб/Чор	78,9	29,0	1,5	71,7
7	Asterix	UD0102065	Нідерл	81,7	30,0	2,3	50
8	Sonata	UD0101735	Канада	72,6	24,9	1,9	40
9	Peko	UD0101738	Канада	81,7	25,2	1,6	65
10	Verdi	UD0101734	Канада	56,6	30,5	2,0	50

В проведених дослідженнях встановлено різну здатність до калюсогенезу вивчених генотипів гороху (таб.1). Інтенсивність калюсогенезу на всіх типах живильного середовища коливалась від 8,7% до 100% (рис.1). Найкращим для калюсогенезу виявилось середовище III. За даними інших дослідників [4] у гороха спостерігали внутрішньовидову мінливість за калюсоутворенням в залежності від генотипу на так званому мінімальному живильному середовищі з низьким вмістом фітогормонів. При вирощуванні калюсів на живильному середовищі з високим вмістом фітогормонів ця різниця потім нивілювалась. Результати наших досліджень, обраховані за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу, свідчать про те, що інтенсивність



калюсоутворення знаходилась у більшій залежності від живильного середовища ($F=3,02/F_{кр}=2,96$), ніж від генотипу ($F=0,52/F_{кр}=2,25$).

Рис.1. Калюсогенез різних сортів гороху

У проведених нами дослідженнях впливу чотирьох середовищ на калюсогенез встановлено, що у вивчених генотипів цей показник для середовища I склав 82,5%, II – 85,1%, III- 87,6%, IV- майже в 1,5 рази менше – 52%. Середовище IV мало найвищу концентрацію БАП (12 мг/л). На підставі цих даних можна припустити, що гороху притаманний високий ендогенний вміст цитокінінів, тому додавання екзогенного БАПу у високій концентрації перевищує характерну для цього виду біологічну межу і викликає пригнічення інтенсивності калюсогенезу.

Наступний важливий етап культивування *in vitro* морфогенез. Морфогенез на експлантах гороху спостерігався у всіх сортів. Для різних генотипів спостерігали різну його інтенсивність. Регенераційну здатність забезпечує механізм, який виробився в процесі еволюції і впливає на підтримання певного гормонального статусу. Для інших видів рослин, наприклад для кукурудзи, ознака “здатність до регенерації” успадковується за домінантним типом, за цією ознакою проявляється ефект гетерозису [14]. В наших дослідженнях інтенсивність морфогенезу на різних середовищах коливалась в межах від 7,1% до 44%. Найкращим для морфогенезу було середовище IV. Істотних переваг впливу середовища ($F=1,17/F_{кр}=2,96$) та генотипу ($F=1,24/F_{кр}=2,25$) на цей процес не виявлено. В дослідженнях інших авторів [19] встановлено, що причиною внутрішньовидової мінливості гороху за ознакою регенерації на середовищі без фітогормонів є різниця в їх гормональному статусі. Визначений ендогенний вміст фітогормонів та чутливість до них тканин може сильніше вплинути на морфогенез, ніж екзогенне додавання фітогормонів. Ендогенний баланс гормонів, його лабільність є одним з механізмів адаптації вищих рослин до зовнішнього середовища.

Морфогенез без урахування середовища знаходився в межах від 15 до 36% (таб.1). Вважається, що високій регенерації лінії відповідає висока здатність до трансформації. Тому, якщо передбачати таку можливість, можна бачити, як вивчені сорти відрізняються за цією здатністю. (таб.1) .

Пагоногенез у різних генотипів на всіх середовищах, становив від 1,3 до 3,5 шт (таб.1). Найкращим для морфогенезу виявилось середовище IV. За результатами двофакторного аналізу виявлено більший вплив на цей показник середовища ($F=3,6/F_{кр}=2,96$) ніж генотипа ($F=0,76/F_{кр}=2,25$).

Ризогенез *in vitro* у гороху супроводжується певними труднощами [3, 4]. В проведених дослідженнях пагони з усіх чотирьох середовищ висаджували на середовище для дорощування. Після цього пагони переносили на ризогенне середовище. За результатами виконаних нами досліджень ризогенез спостерігався у 10 - 90% пагонів (таб.1). Ризогенез залежав перш за все від генотипу зразка. Попереднє культивування експлантів на середовищах з різним вмістом фітогормонів викликало різницю в ризогенезі в межах 10%. У пагонів з середовища I та IV з вмістом БАП 5 мг/л та 12 мг/л відповідно був інтенсивніший ризогенез. Це явище скоріш за все пов'язано зі зниженням ендогенного синтезу БАП, як наслідок високого екзогенного їх вмісту в середовищі культивування, і як відомо, середовище з високою концентрацією НОК та низькою концентрацією або відсутністю БАП оптимальне для регенерації коренів. Досвід деяких досліджень свідчить, що наявність високої концентрації цитокінінів викликає пригнічення ризогенезу [13], тому низька здатність до ризогенезу гороху може бути непрямым свідченням високого ендогенного вмісту цитокінінів у гороху, що співпадає з відомим досвідом інших дослідників.

Висновки

Таким чином калюсо- та морфогенез гороху у значній мірі залежить від

середовища культивування, тобто від екзогенних фітогормонів. Низька здатність гороху до ризогензу визначається генотипом зразка. Такі особливості культивування гороху *in vitro* слід враховувати при підборі зразків для біотехнологічних досліджень.

Література

1. Kosturkova G., Angelov G., Rodeva R., Tchorbadjieva M., Mehandjiev A. *In vitro* modelling of biotic stress-higher Resistance of pea cultures to *Phoma medicaginis* var. *pinodella* culture filtrates//Proceedings Vth Int.Symposium "BioProcesses'03", Sofia.-2003.-P.186-189.
2. Соболева Г.В., Лаханов А.П. Разработка методов отбора соматональных вариантов гороха (*Pisum sativum* L.), устойчивых к действию осмотического стресса // Регуляция продукционного процесса сельскохозяйственных растений: Материалы Всероссийской НПК, посвященной памяти А.П. Лаханова (октябрь 2005 г.), ч.2. -Орел: Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур, 2006. -С.177-184.
3. Жаркова Т.В., Дейнеко В.К., Шумный В.К. Скрининг различных образцов гороха (*Pisum sativum*) по морфологической способности в культуре *in vitro* //Цитология и генетика.-1998.-Т.32, №3.-С.36-42.
4. Лутова Л.А., Забелина Е.К. Каллусо- и побегообразование у различных форм гороха (*Pisum sativum* L.) в условиях *in vitro* // Генетика.- 1988.-Т.24.-№9.-С.1632-1640.
5. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp.Cell. Res. -1968. -50. -№1. -P.151-158.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. -1962. -15. -P.473-497.
7. Kosturkova G., Dimitrova M., Mehandjiev A. *In vitro* organogenic potential of new mutant lines of pea (*Pisum sativum*) // Plant Science (Bg), (Растениеведни науки).-2005.-V.42.-N3.-P.222-225.
8. Соболева Г.В., Зеленов А.Н. Морфогенез и регенерация растений в длительно пассируемой каллусной культуре гороха посевного (*Pisum sativum* L.) //Научное обеспечение производства зернобобовых и крупяных культур.-Орел, 2004.-С.213-219.
9. Кузнецова О.И. Аш О.И., Гостимский С.А. Изучение влияния продолжительности культивирования каллусов на накопление генетических изменений у регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) // Генетика.- 2006.-Т.42.-№5.-С.684-692.
10. Griga M., Tejklova E., Novak F.J. Hormonal regulation of growth of pea (*Pisum sativum* L.) shoot apices *in vitro* culture //Rostl.Vyr.-Olomouc.-1984.-V.30, N.5.-P.523-530.
11. Вольф В.Г. Статистическая обработка опытных данных.-1966.-М. Колос.-255с.
12. Koorneef M., Hanhart C.J., Martinelli L. A genetic analysis of cell culture traits in tomato //Theor. and Appl. Genet.-1987.-74,N5.-P.633-641.
13. Suresh K.A., Reddy T.P., Reddy G.M. Genetic analysis of certain *in vitro* and *in vivo* parameters in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) //Theor. and Appl. Genet.-1985.-70, N2.-P.151-156.
14. Чеченева Т.Н., Труханов В.А. Генетическая обусловленность каллусообразования и регенерационной способности у кукурузы //Цитология и генетика.-1994.-28.-№5.-С.46-50.
15. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.-К.Логос, 2005.-730 с.
16. Miah M.A.A., Earle E.D., Khush G.S. Inheratance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa* L.// Theor. and Appl. Genet.-1985.-70, N2.-P.113-116.
17. Игнатова С.А., Белоусов А.А.Сидоренко Л.В. Генотипическая специфичность морфогенетических процессов в культуре соматических тканей кукурузы // Цитология и генетика.-1993.-27, №3.-С.39-44.
18. Копертех Л.Г., Бутенко Р.Г. Нативные фитогормоны экспланта и морфогенез пшеницы *in vitro* //Физиология растений-1995.-42.-№4.-С.555-558.
19. Лутова Л.А., Бондаренко Л.В., Бузовкина И.С., Левашина Е.А., Тиходеев О.Н., Ходжайова Л.Т., Шарова Н.В., Шишкова С.В. Влияние генотипа растения на регенерационные процессы // Генетика.- 1994.-Т.30.-№8.-С.1065-1074.

Резюме

Результати культивування 10 сортів гороху (*Pisum sativum* L.) *in vitro* свідчать про значну залежність калюсогенезу, морфогенезу від середовища культивування, ризогенезу – від генотипу зразка.

Результаты культивирования 10 сортов гороха (*Pisum sativum* L.) *in vitro*

свидетельствуют о значительной зависимости каллусогенеза, морфогенеза от среды культивирования, ризогенеза – от генотипа образца.

Results of 10 pea (*Pisum sativum* L.) cultivars *in vitro* cultivation show, that callusogenesis, shoot formation more depend from medium components, risogenesis – from genotype.

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

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,

Украина, 0302, Киев, ул. Васильковская 31/1, e-mail: oltyko@gmail.com

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ИНДУКЦИЮ РЕГЕНЕРАЦИИ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) является одной из важнейших масличных культур, однако на мировом рынке еще не появились его биотехнологические продукты. Основными причинами, которые замедляют прогресс в улучшении этой культуры методами генетической инженерии, являются отсутствие рутинной системы регенерации и низкая эффективность стабильной трансформации [1].

Основное внимание исследователей при разработке системы методов генетической трансформации подсолнечника обращено на *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию, за счёт которой наиболее часто наблюдается стабильная интродукция рекомбинантных молекул в его геном [2]. Несмотря на компетентность к агробактериальной инфекции, *H. annuus* с трудом поддается классическим методам агробактериальной трансформации. Прогресс в повышении частоты трансформации был достигнут с разработкой способа поранения эксплантатов бомбардировкой микрочастицами вольфрама до инокуляции с агробактериями [4]. Другие подходы связаны с обезвоживанием и последующей регидратацией, инфльтрацией, использованием пектиназ [5,6]. Тем не менее, эффективность трансформации подсолнечника все еще остается на низком уровне, поэтому существует необходимость оптимизации системы методов интродукции Т-ДНК в его геном.

Для повышения частоты трансформации некоторых культур успешно применяют ультразвуковую обработку [8]. В связи с этим на первоначальном этапе работы мы анализировали влияние ультразвука на морфогенетический потенциал инбредных линий подсолнечника, где в качестве эксплантата при культивировании *in vitro* использовали сегмент 4-дневного этиолированного проростка.

Материалы и методы

Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника: 96А/3, 16А/3 и 70А/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института). Зрелые семена стерилизовали 96% раствором этанола на протяжении 2 мин и 10% раствором хлорамина 30-40 мин с последующим трехкратным промыванием в дистиллированной воде. Затем высаживали на питательную среду Мурашиге-Скуга (МС); культивировали 4 дня при температуре 25 °С – 26 °С. В качестве первичного эксплантата использовали часть семядоли с гипокотилем, которые подвергали действию ультразвука с использованием ультразвукового диспергатора УЗДН-1 У4.2 при частоте 44 кГц, 25 °С. После этого эксплантаты высаживали на модифицированную нами питательную среду МС (контроль, МСК) [3], дополненную химическим компонентом, содержащим сульфгидрильную группу (МСХ). Частоту регенерации исследуемых линий оценивали как процентное соотношение регенерантов к общему количеству или эксплантатов (S/E), или регенерирующих эксплантатов (S/RE).

Результаты и обсуждение