

***ДИНАМІКА МОРФОГЕННИХ ПРОЦЕСІВ У КУЛЬТУРИ
ГІНОГЕННИХ КАЛЮСІВ ТА РОСЛИН МОРКВИ IN VITRO***

Сергієнко О.Ф.

Інститут овочівництва і баштанництва НААН

Вивчено вплив тривалого культивування гіногенних калюсів моркви на їх морфогенні властивості. У десятому пасажі проліферативна здатність калюсів підвищилась у 4 рази, а ембріогенна – знизилась у 2 рази порівняно з четвертим пасажем.

Ембріогенна здатність соматичних тканин з гіногенних рослин-регенерантів була не вищою, ніж у гіногенних калюсних клонів, з яких ці рослини походили. У тканин з андрогенної рослини – відмічено зростання ембріогенного потенціалу порівняно з вихідним андрогенним калюсним клоном.

Морква, експериментальна гаплоїдія in vitro, гіногенні калюси, динаміка проліферативної та ембріогенної здатностей

Метод експериментальної гаплоїдії скорочує терміни створення гомозиготних ліній культурних рослин на кілька років порівняно з методом інбридингу. Особливо актуальним є названий спосіб для моркви, що має дворічний цикл розвитку.

В цьому напрямку на моркві здійснюються дослідження у Росії, Польщі, Швеції, Китаї, Японії та інших країнах [1]. Дигаплоїдні рослини моркви створюють шляхом як андрогенезу [2], так і гіногенезу *in vitro* [3].

Аналогічні розробки проводяться також у Інституті овочівництва і баштанництва НААН з метою прискореного створення гомозиготних ліній моркви для гетерозисної селекції. Шляхом культури *in vitro* незапліднених насіннєзачатків моркви одержано 84 калюсних клони. Виникла необхідність тривалого підтримання цього цінного матеріалу.

В літературних джерелах відсутні відомості про морфогенні властивості тканин моркви гіногенного походження. Стаття присвячена дослідженням проліферативної та ембріогенної здатностей гіногенних калюсів моркви та їх збереженню протягом тривалого культивування в умовах *in vitro*.

Матеріали і методи. Дослідження проводили в Інституті овочівництва і баштанництва НААН протягом 2003-2005 рр. Вивчали проліферативну активність 21 та ембріогенну активність 15 гіногенних калюсних клонів моркви, що походили з однієї рослини полікросного гібрида F₁ 8067, дібраної за рядом селекційно-важливих ознак. Гіногенні калюсні клони отримали в культурі незапиленних насіннєзачатків *in vitro* за розробленою нами методикою [4]. Кожен клон походив з окремого насіннєзачатка.

Проліферативну здатність калюсів оцінювали у четвертому та десятому пасажах на середовищі B5 з додаванням 2,4-Д та кінетину по 0,1 мг/л кожного. Кожен клон був представлений 10 калюсами, вихідний розмір яких становив 5×5×5 мм. Проліферативну здатність визначали після 40 діб культивування шляхом порівняння об'ємів калюсів. Об'єм калюсів визначали як добуток довжини, ширини та товщини калюсу.

Індукцію ембріодів здійснювали у п'ятому та одинадцятому пасажах на живильному середовищі MSC [5]. Використовували по 20 калюсів кожного клону розміром 10×10×10 мм. Умови культивування об'єктів: температура 23 ± 2°C, освітленість 1000 лк, фотоперіод 16 годин. Кількість ембріодів на калюсах визначали візуально через 40 діб культури. Рослини з ембріодів одержували за розробленою нами методикою [6].

У дослідженні ембріогенної здатності соматичних тканин дигаметоїдних рослин-регенерантів використовували по одній рослині з гіногенних клонів 23 і 35, одержаних з генотипу F₁ 8067 та з андрогенного клону 57, одержаного з сорту Яскрава. Рослини-регенеранти були вирощені в культурі *in vitro* і мали по 5-6 справжніх листків. Калюси отримували з черешків листків згідно розробленої нами методики [6]. Індукцію соматичного ембріогенезу з калюсів здійснювали у третьому пасажі на безгормональному середовищі MSC [5]. Використовували по 20 калюсів кожного клону.

Математико-статистичний аналіз результатів проводили за існуючими методами [7].

Результати і обговорення. В дослідженнях виявлено, що калюсні клони, одержані з насіннєзачатків, у IV пасажі істотно відрізнялись між собою за здатністю до проліферації (табл. 1). Середній об'єм калюсів гіногенних калюсних клонів становив 629,51 ± 70,2 мм³. Відмічено, що гіногенні калюси ростуть загалом повільніше, ніж соматичні [8]. Коефіцієнт варіації об'ємів гіногенних калюсних клонів становив 51,1 ± 7,9 %, що свідчить про гетерогенність за цією ознакою гіногенних клонів, утворених з генеративних клітин однієї рослини.

У IV пасажі виділено наступні гіногенні клони, проліферативна здатність яких була вищою за середню по досліді: 20, 26, 28, 30, 31, 32, 34.

У X пасажі середній об'єм гіногенних калюсних клонів зріс порівняно з IV пасажем у 4,5 рази ($2875,6 \pm 267,0 \text{ мм}^3$), що, очевидно, пояснюється адаптацією калюсних тканин до умов *in vitro* (табл. 1). Відмінності між клонами були істотними. Проліферативний потенціал, притаманний окремим калюсним клонам у IV пасажі до певної міри зберігався у X пасажі. Про це свідчить посередній коефіцієнт кореляції ($r = 0,42 \pm 0,26$) між досліджуваними пасажами (табл. 2).

Таблиця 1

Вплив тривалості культивування *in vitro* на морфогенні характеристики гіногенних калюсних клонів у 2003-2004 рр.

№ клону	Об'єм калюсів, мм ³		Вихід ембріоїдів, шт./калюс	
	4-й пасаж	10-й пасаж	5-й пасаж	11-й пасаж
12	560,4	2550,8	3,4	1,5
14	590,4	3185,5	0,4	1,4
17	626,2	-	-	-
20	785,2	-	4,4	-
21	608,8	2000,0	3,8	0,5
22	416,0	2134,1	5,6	1,5
23	_*	2496,8	-	1,4
24	623,8	2245,5	-	0,2
26	735,2	2368,1	1,4	1,4
28	756,8	4217,0	0,8	3,4
30	816,8	5515,0	1,4	1,9
31	704,0	2244,3	-	0,2
32	746,6	1167,4	-	1,0
34	909,0	4926,8	2,4	0,1
35	584,6	2832,3	2,6	2,5
36	518,8	3423,9	7,0	2,0
38	535,8	3707,8	5,2	4,7
39	646,6	1722,1	-	1,2
44	526,2	1909,8	5,2	0,2
45	476,6	2986,5	-	0,7
46	423,4	2711,0	1,0	0,2
49	628,6	3168,1	2,0	1,9
НІР ₀₅	140,36	752,88	3,39	2,12
Середнє	$629,51 \pm 70,2$	$2875,6 \pm 267,0$	$3,1 \pm 1,2$	$1,4 \pm 0,8$
	НІР ₀₅ = 556,15		НІР ₀₅ = 1,68	

Примітка. * – внаслідок інфекції кількість калюсів була недостатньою для статистичного аналізу

Таблиця 2

Коефіцієнт кореляції за морфогенними характеристиками гіногенних калюсних клонів між IV та X пасажами *, 2003 р.

Морфогенна ознака	Коефіцієнт кореляції між пасажами, r
Об'єм калюсів	$0,42 \pm 0,26$
Вихід ембріодів з 1 калюсу	$0,10 \pm 0,09$

Примітка. * – вихід ембріодів визначали у V та XI пасажах.

При культивуванні гіногенних калюсних клонів було відмічено, що починаючи з 10-го пасажу вони стали відрізнятися між собою за забарвленням (табл. 3). Спостерігали клони жовтого, ясно-зеленого та зеленого кольорів.

В результаті дослідження динаміки ембріогенної здатності гіногенних калюсів встановлено, що середній вихід ембріодів з 1 калюсу у V пасажі становив $3,1 \pm 1,2$ ембр./калюс. Коефіцієнт варіації між генотипами за цією ознакою досягав $144,3 \pm 27,4$ % і значно перевищував встановлений нами у попередні роки аналогічний показник для соматичних клонів моркви ($44,7 \pm 14,1$ %).

Гіногенні калюсні клони істотно відрізнялись між собою за ембріогенною здатністю (табл. 1). Виділено гіногенні калюсні клони 20, 21, 22, 36, 38, 44, які мали вищий за середній у цих дослідженнях ембріогенний потенціал.

У XI пасажі спостерігали зниження середнього виходу ембріодів у 2 рази ($1,4 \pm 0,8$) порівняно з V пасажем (табл. 1). Виявлено істотні відмінності між клонами за цим показником, корелятивного зв'язку між пасажами не встановлено ($r = 0,10 \pm 0,09$).

Таблиця 3

Забарвлення гіногенних калюсних ліній моркви, що походили з вихідного генотипу № 266, у X пасажі, 2003 р.

№ калюсного клону	Забарвлення
28	ясно-зелене
30	зелене
31	жовте
34	зелене
35	жовте
36	ясно-зелене, майже біле
38	ясно-зелене
44	жовте
45	ясно-зелене
46	жовте

Гіногенний клон 14, який у XI пасажі продукував 1,4 ембріоїди з 1 калюсу, продовжували культивувати далі. У XV пасажі цей клон майже втратив ембріогенну здатність і утворив лише 0,11 ембр./калюс.

З метою визначення здатності до мікророзмноження гіногенних та андрогенних рослин було вивчено рівень соматичного ембріогенезу трьох гаметогенних регенерантів, що перебували у фазі 5–6 справжніх листків. Основою цього досліджу була робоча гіпотеза про те, що гаметогенні рослини, які успішно регенерували і нормально розвивались, могли набути більш високого ембріогенного потенціалу за рахунок соматоклональної мінливості, ніж калюсні клони, з яких вони походили. Так, за даними Чеченєвої Т.М. (2003), шляхом добору у культурі *in vitro* створено соматоклональні інбредні лінії кукурузи, які мали підвищений регенераційний потенціал [9].

Виявлено, однак, що вихід соматичних ембріонів у рослин клонів 23 і 35 становив відповідно $0,3 \pm 0,1$ і $1,3 \pm 0,3$ ембр./калюс (табл. 4) і був нижчим, ніж у вихідних гіногенних калюсних клонів, з яких вони утворені ($1,4 \pm 0,7$ та $2,5 \pm 1,1$ ембр./калюс відповідно) (табл. 4). Натомість, у андрогенної рослини клону 57 спостерігали істотне підвищення ембріогенного потенціалу з $0,3 \pm 0,1$ ембр./калюс до $2,8 \pm 0,7$ ембр./калюс.

Таблиця 4

Вихід соматичних ембріодів у третьому пасажі з соматичних калюсів, одержаних з дигаплоїдних рослин, 2005 р., шт. / калюс

№ гаметогенного клону	Вихідний генотип	Спосіб створення дигаплоїдних рослин	Вихід ембріодів з 1 вихідного калюсу, ембр./калюс	Вихід ембріодів з 1 калюсу з рослини-регенеранта, ембр./калюс
23	F ₁ 8067	гіногенез <i>in vitro</i>	$1,4 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,1$
35	F ₁ 8067	-//-	$2,5 \pm 1,1$	$1,3 \pm 0,3$
57	сорт Яскрава	андрогенез <i>in vitro</i>	$0,3 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,7$
Середнє			$1,4 \pm 0,80$	$1,45 \pm 0,44$

Середній вихід ембріодів з калюсів усіх гаметогенних рослин-регенерантів ($1,45 \pm 0,44$ ембр./калюс) не перевищував середнього рівня вихідних калюсів ($1,4 \pm 0,80$ ембр./калюс). Отже, ембріогенна здатність ізольованих тканин з гіногенних рослин-регенерантів у наших дослідженнях не підвищилась порівняно з вихідними гаметогенними калюсними клонами, а у тканин з андрогенної рослини – відмічено зрос-

тання ембріогенного потенціалу. Ці дані свідчать про можливість результативного добору серед дигапloidних рослин за цією ознакою.

Одержані в дослідженнях первинні гіногенні ембріоїди, на відміну від соматичних, не мали здатності до нормального розвитку, що узгоджується з даними, одержаними в Росії [10]. Лише 6,3 % з них розвинулись у нормальні рослини, тоді як середній вихід рослин з соматичних ембріоїдів у наших попередніх дослідженнях становив $66,6 \pm 6,5$ % [11]. З первинних було індуковано вторинні ембріоїди, які утворили нормальні рослини.

Гіногенні регенеранти моркви відзначались низьким рівнем приживлення у горщечках з ґрунтосумішшю. Так, середня частка приживлених гіногенних рослин у 2004 року становила $10,7 \pm 3,6$ %, тоді як на аналогічному субстраті приживалось $75,4 \pm 5,2$ % рослин, одержаних з соматичних ембріоїдів. Отже, існує необхідність розробки способів підвищення виходу нормальних гіногенних рослин та їх приживлення *ex vitro*.

Висновки. 1. Середній об'єм гіногенних калюсних клонів у X пасажі зріс порівняно з IV пасажем у 4,5 рази, що пояснюється адаптацією калюсних тканин до умов *in vitro*.

2. Середній вихід ембріоїдів у XI пасажі знизився порівняно з V пасажем у 2 рази.

3. Ембріогенна здатність ізольованих тканин з гіногенних рослин-регенерантів у наших дослідженнях не підвищилась порівняно з вихідними гаметогенними калюсними клонами, а у тканин з андрогенної рослини відмічено зростання ембріогенного потенціалу. Отже, існує можливість результативного добору серед дигапloidних рослин за цією ознакою.

4. Гіногенні рослини-регенеранти мали низьку здатність до нормального розвитку та до приживлення в умовах *ex vitro*.

Список використаних джерел

1. Poliakov A. V. Production of andro- and gynogenic plants of carrot (*Daucus carota* L.). / Poliakov A. V., Pchenko O. V. // Сб. научных трудов междунар. научно-практич. конф. «Биотехнология овощных, цветочных и малораспространенных культур», Москва, 22-25 марта 2004. – М., 2004. – С. 146-150.
2. Górecka K. Embrzoindaction in anter culture of *Daucus carota* L. / K. Górecka, D.-Krzyżanowska, W. Kiszczak, R. Górecki. // Vegetable Crops Research Bulletin. – Skierniewice (Poland): Research institute of vegetable crops. – 2005. – Vol. 63. – P. 25-32.

3. Тюкавин Г. Б. Основы биотехнологии моркови / Г. Б. Тюкавин. – М.: ВНИИССОК РАСХН, 2007. – 479 с.
4. Пат. 30285 Україна U МПК (2006) A01H 1/04, C12N 5/00. Спосіб індукції новоутворень у культурі насіннезародків моркви *in vitro* / Сергієнко О. Ф., Івченко Т. В., Яровий Г. І. ; заявник і власник патенту Інститут овочівництва і баштанництва НААН. - № 0200709889, заявл. 03.09.2007, опубл. 25.02.2008, Бюл. № 4
5. Сергієнко О. Ф. Оптимизация методики микроклонирования моркови / О. Ф. Сергієнко // Фізіологія і біохімія культурних рослин. – К. – 2000. – Т. 32. – С. 232-235.
6. Сергієнко О. Ф. Методика мікроклонування селекційних зразків моркви / О. Ф. Сергієнко, В. Б. Баштан, Т. К. Горова. – Мерефа : ІОБ УААН, 2004. - 12 с.
7. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин - М. : Высшая школа, 1990. - С. 18-237.
8. Сергиенко О. Ф. Индукция каллуса из тканей взрослых растений и семян моркови столовой / О. Ф. Сергиенко // Селекція, насінництво і технологія вирощування овочевих культур. Збірник наук. робіт молодих вчених (до 50-річчя ІОБ УААН). – Харків : ІОБ УААН. - 1997. – С. 77-83.
9. Чеченева Т. М. Спонтанна та індуквана мінливість кукурудзи *in vitro* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора біол. наук / Т. М. Чеченева. - Київ, 2003. – 43с.
10. Тюкавин Г. Б. Культура неопыленных семян моркови / Г. Б. Тюкавин, Н. А. Шмыкова // Матеріали междунар. научно-практич. конф. «Селекция и семеноводство овощных культур в XXI веке». – М. : РАСХН. – 2000. – С. 275-277.
11. Сергієнко О. Ф. Мікроклонування селекційних зразків моркви, особливості розвитку рослин-регенерантів *in situ* / О. Ф. Сергієнко // Вісник аграрної науки. – К. : УААН. – 2002. – №11. – С. 41-43.

Изучено влияние длительного культивирования гиногенетических каллусов моркови на их морфогенетические качества. В десятом пассаже пролиферативная способность каллусов повысилась в 4 раза, а эмбриогенетическая – снизилась в 2 раза сравнительно с четвертым пассажем.

Эмбриогенетическая способность соматических тканей из растений-регенерантов была не выше, чем у гиногенетических каллусных клонов, из которых эти растения происходили. У тканей из андрогенетического растений отмечено возрастание эмбриогенетического потенциала сравнительно с исходным андрогенетическим каллусным клоном.

Efficient of long cultivation of gynogenic carrot calli on their morphogenic signs were studied. In tenth passage proliferatic activity of such calli increased in 4 times and embryogenic activity decreased in 2 times on comparing to fourth passage.

Embryogenic ability of somatic tissues from gynogenic plants-regenerants was not higher then it in gynogenic callus clones, which this plants descended from. Androgenic plant tissues showed increasing embryogenic potential on comparing to parental androgenic callus.