

ОЛІЙНИК Т. М.¹, КОВБАСЕНКО Р. В.^{2✉}, ДМИТРИЄВ О. П.², ДУЛЬНЄВ П. Г.³

¹ Інститут картоплярства НААН України,

Україна, 07853, Київська обл., Бородянський р-н, смт. Немішаєве, вул. Чкалова, 22, e-mail: oliyunik@gmail.com

² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: dmitriev.ap@gmail.com

³ Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В. П. Кухаря НАН України,

Україна, 034276, м. Київ, Харківське шосе, 50, e-mail: dulniev@gmail.com

✉ rayasenko@ukr.net, (097) 753-69-74

МОЖЛИВА ЗАМІНА ЦИТОКІНІНІВ ТА АУКСИНІВ У КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Мета. Провести аналіз ефективності запропонованої нами модифікації класичного МС-середовища, в якій ауксини та цитокініни замінено на похідні класу тетрагідротіофендіоксиду та піридину. **Методи.** Роботу з культурою клітин *in vitro*, зокрема асептичне пророщування насіння, мікроклональне розмноження, калюсогенез та ініціювання різних типів морфогенезу, здійснювали за відомими методиками. Для індукції соматклональної варіабельності використовували два сорти картоплі (*Слов'янка*, *Луговська*) та два сорти томату (*Легідний*, *Бобріцький*). **Результати.** Встановлено здатність препаратів похідних класу тетрагідротіофендіоксиду та піридину виконувати функцію ауксинів та цитокінінів у МС-середовищі за калюсогенезу пасльонових культур *in vitro*. **Висновки.** З'ясовано, що за використання препарату нового покоління (тетрагідротіофендіоксид-піридину) як замітника ауксину та цитокініну в МС-середовищі приріст маси калюсних тканин навіть збільшується. Виготовлення дослідної партії цього замітника виявилось значно дешевшим, ніж синтез або закупівля фітогормонів.

Ключові слова: модифікація МС-середовища, замітник фітогормонів, тетрагідротіофендіоксид-піридин, картопля, томати.

Морфогенетичні процеси у культурі клітин Solanaceae у значною мірою залежать від гормонального складу живильного середовища та сортових особливостей. Калюсогенез є експериментальною базою в дослідженнях із регенерації рослин та генетичної трансформації, а також для отримання соматклональних варіантів і започаткування суспензійних культур [9].

Калюсна тканина являє собою легкодоступний матеріал, який найбільш часто використовують для клітинної селекції під час ство-

рення нових сортів та вихідних форм. Роботу проводять, як правило, на первинній або пересадочній калюсній тканині, що не втратила здатності до регенерації протягом ряду субкультувацій. Однак при цьому трапляються певні труднощі, зокрема – повільний ріст тканини, неоднакова чутливість клітин до дії токсичних речовин, які застосовують у якості селективного фактора, а також втрата регенераційної здатності у процесі культивування *in vitro*. Однією з можливих причин цих явищ є адаптація калюсних агрегатів до фітогормонів [8]. Фітогормони, по суті, – головний компонент живильного середовища, яке зумовлює успіх клітинної селекції [4, 5]. Оптимальним для культивування рослинних клітин *in vitro*, як відомо, є середовище за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [13].

Із метою усунення деяких недоліків під час роботи із калюсними культурами та посилення калюсогенезу ми вирішили дослідити можливість модифікації класичного живильного МС-середовища, у якому ауксини та цитокініни замінено на похідні класу тетрагідротіофендіоксиду та піридину.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були два сорти картоплі *Слов'янка* і *Луговська* та два сорти томату *Легідний* і *Бобріцький*, а також замітник ауксину-цитокінінового комплексу для індукції соматклональної варіабельності *in vitro* – синтезований новий препарат тетрагідротіофендіоксид-піридин. Цей препарат є похідним 3-алкіламіноссульфоланів та цис-транс-3-оксі-4-алкіл(аріл)аміноссульфоланів, що мають досить високу ауксинову та цитокінінову активність.

Роботу з культурою клітин *in vitro*, асептичне пророщування насіння, мікроклональне розмноження, калюсогенез та ініціювання різних типів морфогенезу проводили за відомими

методиками [2, 6] на модифікованому нами агаризованому МС-середовищі. Для отримання калюсної культури використовували апекси, сегменти гіпокотилу, стебла та живця листка пробіркових рослин вихідних сортів картоплі та томату.

Результати та обговорення

У першій серії експериментів для стимуляції калюсогенезу томатів в МС-середовище замість цитокініну та ауксину додавали тетрагідротіофендіоксид-піридин у різних концентраціях (табл. 1). Легко побачити, що за ефективністю стимуляції калюсогенезу в обох сортів картоплі модифіковане нами живильне середовище не поступається класичному МС-середовищу. Одержана на модифікованому середовищі калюсна тканина за структурою не відрізнялася від калюсних тканин контрольного варіанта. Калюси сорту *Слов'янка* мали яскраво зелене забарвлення і гладеньку, з окремими щільними глобулами поверхню, а сорту *Луговська* були зеленими, компактними, з поодинокими глобулами. У всіх варіантах помічено приріст калюсної тканини від 1,5 до 10,0 %.

У другій серії експериментів для стимуляції калюсогенезу двох сортів томату до складу живильного МС-середовища додавали такі ж концентрації препарату замість комплексу фіто-

гормонів (табл. 2). У контрольному варіанті сорту томату *Легідний* помічали приріст більш крихкої калюсної тканини темно-зеленого забарвлення. У калюсів листового експланта сорту томату *Бобріцький* спостерігали утворення окремих зелених зон із білим опушенням і утворення поодиноких зелених глобул. Таку ж тенденцію спостерігали і за використання різних концентрацій (30, 40, 50 мг/л) тетрагідротіофендіоксид-піридину в середовищі, де помічено приріст калюсної тканини від 1,0 до 11,1 %.

Вивчення та оптимізація умов індукції морфогенезу із калюсних тканин є необхідною складовою в дослідженнях з удосконалення та здешевлення живильних середовищ для цього процесу. На табл. 3 та 4 представлено особливості морфогенезу калюсних тканин на модифікованому живильному середовищі із застосуванням різних концентрацій тетрагідротіофендіоксид-піридину.

Одержані дані свідчать про те, що під час формування рослин-регенерантів пасльонових культур калюсні тканини із модифікованого нами середовища за перенесення на морфогенне живильне середовище не поступалися за ростом і розвитком регенерантам контрольного варіанта. Помічено стабільний приріст рослин-регенерантів як у сортів картоплі, так і у сортів томатів.

Таблиця 1. Приріст калюсної тканини картоплі залежно від складу живильного середовища

Доба культивування, дні	Маса калюсної тканини, мг			
	МС-середовище (контроль)	МС-середовище + тетрагідротіофендіоксид – піридин, мг/л		
		30	40	50
Сорт Слов'янка				
0	7,3 ± 0,4	7,5 ± 0,5	7,4 ± 0,4	7,3 ± 0,6
7	12,4 ± 0,8	13,0 ± 0,9	13,1 ± 0,8	13,3 ± 1,0
14	18,5 ± 1,0	19,2 ± 1,1	19,3 ± 1,0	19,5 ± 0,9
21	21,9 ± 0,9	22,5 ± 1,3	22,7 ± 1,1	22,9 ± 1,0
28	28,0 ± 1,2	28,6 ± 1,4	28,8 ± 1,6	29,1 ± 1,1
35	30,7 ± 1,3	31,4 ± 1,1	31,7 ± 0,9	32,0 ± 1,0
42	33,4 ± 1,4	33,9 ± 1,3	34,2 ± 1,2	34,4 ± 1,1
Сорт Луговська				
0	5,8 ± 0,7	6,0 ± 0,4	5,9 ± 0,4	6,1 ± 0,5
7	10,0 ± 0,8	10,5 ± 0,7	10,8 ± 0,8	11,0 ± 0,7
14	16,0 ± 1,0	16,5 ± 0,9	16,9 ± 1,0	17,3 ± 1,1
21	20,0 ± 1,1	20,6 ± 1,3	20,9 ± 1,2	21,3 ± 1,0
28	26,0 ± 1,4	26,5 ± 1,4	26,9 ± 1,3	27,2 ± 1,2
35	28,3 ± 1,5	28,9 ± 1,3	29,3 ± 1,4	29,7 ± 1,5
42	31,2 ± 1,8	31,7 ± 1,3	32,0 ± 1,2	32,4 ± 1,4

Таблиця 2. Приріст калусної тканини томату залежно від складу живильного середовища

	Маса калусної тканини, мг			
	МС-середовище (контроль)	МС-середовище + тетрагідротіофендіоксид – піридин, мг/л		
		30	40	50
Сорт Лагідний				
0	13,5 ± 1,0	13,7 ± 1,1	13,9 ± 1,2	14,1 ± 1,3
7	17,4 ± 1,1	17,9 ± 1,2	18,3 ± 1,2	18,6 ± 1,1
14	24,1 ± 2,3	24,6 ± 1,3	24,8 ± 1,3	25,0 ± 1,2
21	36,5 ± 2,6	36,9 ± 1,2	37,2 ± 1,4	37,5 ± 1,3
28	40,0 ± 2,5	40,4 ± 1,1	40,8 ± 1,0	41,2 ± 1,1
35	43,4 ± 2,4	43,9 ± 1,2	44,3 ± 1,3	44,7 ± 1,1
42	45,2 ± 2,4	45,9 ± 1,5	46,4 ± 1,4	46,8 ± 1,3
Сорт Бобрицький				
0	6,0 ± 0,5	6,2 ± 0,4	6,1 ± 0,3	6,2 ± 0,4
7	9,4 ± 0,7	9,9 ± 0,5	10,2 ± 0,4	10,4 ± 0,3
14	14,0 ± 1,0	14,7 ± 0,6	14,9 ± 0,5	15,3 ± 0,7
21	18,3 ± 1,1	18,9 ± 0,5	19,2 ± 0,6	19,5 ± 0,6
28	22,4 ± 1,2	22,9 ± 0,6	23,3 ± 0,7	23,7 ± 0,5
35	23,0 ± 1,2	23,6 ± 0,4	23,9 ± 0,4	24,1 ± 0,4
42	25,6 ± 1,3	25,9 ± 0,5	26,1 ± 0,5	26,3 ± 0,4

Таблиця 3. Формування рослин-регенерантів картоплі залежно від складу живильного середовища

Тривалість культивування, доби	Висота рослин, мм			
	МС-середовище (контроль)	МС-середовище + тетрагідротіофендіоксид- піридин, мг/л		
		30	40	50
Сорт Слов'янка				
14	21,7 ± 1,13	22,4 ± 1,24	23,1 ± 1,33	23,8 ± 1,32
21	32,4 ± 1,24	33,0 ± 1,34	33,6 ± 1,42	34,1 ± 1,45
28	41,3 ± 1,55	42,0 ± 1,64	42,4 ± 1,68	42,9 ± 1,70
35	55,6 ± 1,63	56,0 ± 1,72	56,9 ± 1,69	57,3 ± 1,67
Сорт Луговська				
14	19,8 ± 1,04	20,2 ± 1,12	20,5 ± 1,18	20,8 ± 1,21
21	29,0 ± 1,19	29,8 ± 1,22	30,4 ± 1,24	30,9 ± 1,29
28	38,4 ± 1,86	38,9 ± 1,91	39,3 ± 1,89	39,9 ± 1,87
35	51,3 ± 2,04	51,5 ± 1,98	51,8 ± 1,96	52,0 ± 1,94

У подальшому рослини-регенеранти відокремлювали від калусної тканини і розмножували живцюванням. На 21-й день культивування рослини були добре розвинені – листові пластинки правильної форми та інтенсивного зеленого забарвлення, коренева система повноцінно утворювалася на 14-й день культивування. Застосування препарату нового покоління тетрагідротіофендіоксид-піридину як заміника ауксину та цитокініну в середовищі для культури *in vitro* виявилось ефективним та, як з'ясувалося, більш економічним з погляду здешевлення вартості МС-середовища.

Одержані нами дані узгоджуються з результатами інших авторів, які вивчали модифікацію класичного МС-середовища із заміною регуляторів росту. Так, за мікронального розмноження рослин *Irissibirica*, *Syringavulgaris* та *Hedysarumteinum* досліджували стимулюючу ріст активність продуктів карбоксиметилування рослинної сировини під час використання їх у живильному середовищі замість ауксинів. Встановлено, що, на відміну від синтетичних гормонів, ці продукти більш ефективно стимулювали зростання числа коренів, посилювали ріст пагонів та коренів [1].

Таблиця 4. Формування рослин-регенерантів томату залежно від складу живильного середовища

Доба культивування, дні	Висота рослин, мм			
	МС-середовище (контроль)	МС-середовище + тетрагідротіофендіоксид – піридин, мг/л		
		30	40	50
Сорт Лагідний				
14	22,4 ± 1,21	22,9 ± 1,23	23,2 ± 1,21	23,4 ± 1,19
21	33,0 ± 1,44	33,7 ± 1,48	33,9 ± 1,45	34,2 ± 1,47
28	43,8 ± 1,85	44,4 ± 1,88	44,8 ± 1,85	45,2 ± 1,90
35	56,0 ± 1,76	56,5 ± 1,77	56,8 ± 1,75	57,1 ± 1,88
Сорт Бобриський				
14	17,4 ± 0,98	17,9 ± 0,99	18,3 ± 1,11	18,7 ± 1,08
21	28,0 ± 1,45	28,5 ± 1,39	28,8 ± 1,44	29,1 ± 1,43
28	36,9 ± 1,39	37,2 ± 1,35	37,5 ± 1,41	38,0 ± 1,40
35	49,0 ± 1,78	49,5 ± 1,71	49,9 ± 1,69	50,2 ± 1,71

Доведено, що додавання до живильного середовища відновленого глутатіону (250–500 мкМ) або аскорбінової кислоти (500–750 мкМ) сприяло зростанню кількості утворених адвентивних стебел [11]. В іншій роботі з'ясовано, що частота калюсоутворення у культурі недозрілих зародків пшениці детермінується також кремнійорганічним компонентом (синтезовані водорозчинні морфолініопохідні сілатрани) живильного середовища [7]. Виявлено доцільність застосування полівінілпіролідону та тіосульфату натрію для продовження терміну життя тканин, що розмножуються методом поверхневого культивування рослин, які вимогливі до частоті зміни поживного середовища [10].

Виявилося, що додавання до складу живильного середовища препаратів цитедоф та дропп із цитокініною активністю стимулює процес утворення адвентивних бруньок, формування мікростебел та збільшує коефіцієнт розмноження у бересклета карликового, діоскорей кавказької та кірказона маньчжурського [3]. Інша модифікація полягала в тому, що за знижених норм використання ауксинів та цитокінінів до живильного МС-середовища у культурі *in vitro*

додавали 0,25 мг/л епібрасінолідну для регенерації *Vaccinium corymbosum* [12].

Висновки

Досліджено можливість індукції калюсогенезу пасльонових культур із заміною ауксину та цитокініну у класичному прописі МС-середовища на синтезований новий препарат тетрагідротіофендіоксид-піридин. Виявилося, що за ефективністю ауксину-цитокініновий замінник у живильному МС-середовищі не поступається і навіть переважає класичне МС-середовище з фітогормонами. Це дозволяє заощадити кошти для проведення подальших досліджень. Собівартість цього замінника значно нижча за ціну стандартних фітогормонів для МС-середовища. Виготовлення його дослідної партії виявилося значно дешевшим, ніж синтез або закупівля фітогормонів. Отже, застосування нового фізіологічно активного синтетичного замінника фітогормонів є більш ефективним та економічним із погляду здешевлення вартості МС-середовища. Ми вважаємо, що використання тетрагідротіофендіоксид-піридину під час вирощування інших рослин у культурі *in vitro* теж може дати позитивні результати.

References

- Bazarnova N.G., Tikhomirova L.I., Frolov N.S., Pavlushin A.E., Kurchanova E.A. Influence of a growth stimulator of plant origin on the morphogenesis of *Iris sibirica* L., *Syringavulgaris vulgaris* Krasnob., *Hedysarum teinum* L. *in vitro*. *Chemistry of plant materials*. 2013. № 3. P. 243–248. [in Russian] / Базарнова Н.Г., Тихомирова Л.И., Фролов Н.С., Павлушин А.Е., Курчанова Е.А. Влияние стимулятора роста растительного происхождения на морфогенез *Iris sibirica* L., *Syringavulgaris vulgaris* Krasnob., *Hedysarum teinum* L в культуре *in vitro*. *Химия растительного сырья*. 2013. № 3. С. 243–248.
- Butenko R.G. Plant cell culture and biotechnology. M: Nauka, 1986. 344 p. [in Russian] / Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. М: Наука, 1986. 344 с.
- Kalashnikova E.A., Doan Thu Thuy Study of the effect of nontraditional growth regulators on the morphogenetic activity of isolated explants and the transplant culture of *Euonymus*, *Dioscorea* and *Kirkazon*. *In vitro biology of plant cells and biotechnology*: Sbornik tezisev 10th International conf. (Kazan, 14–18 October, 2013). Kazan: KIBB KNC RAN. P. 123

- [in Russian] / Калашникова Е.А., Доан Тху Тхуи Изучение влияния нетрадиционных регуляторов роста на морфогенетическую активность изолированных эксплантов и пересадочной культуры бересклета, диоскореи и кирказона. *Биология клеток растений in vitro и биотехнология*: Сборник тезисов 10 междунар. конф. (Казань, 14–18 октября 2013 г.). Казань: КИББ КНЦ РАН, 2013. С. 123.
4. Kulaeva O.N. Hormonal regulation of physiological processes in plants at the level of RNA and protein synthesis. M: Nauka, 1982. 159 p. [in Russian] / Кулаева О.Н. Гормональная регуляция физиологических процессов у растений на уровне синтеза РНК и белка. М: Наука, 1982. 159 с.
 5. Kulaeva O.N., Khokhlova V.A., Feofanova T.A. Cytokinines and abscisic acid in the regulation of growth and processes of intracellular differentiation. *Hormonal regulation of plant ontogenesis*. M: Nauka, 1984. P. 71–86. [in Russian] / Кулаева О.Н., Хохлова В.А., Феофанова Т.А. Цитокинины и абсцизовая кислота в регуляции роста и процессов внутриклеточной дифференцировки. *Гормональная регуляция онтогенеза растений*. М: Наука, 1984. С. 71–87.
 6. Kushnir G.P., Sarnatska V.V. Microclonal propagation of plants. K: Naukova dumka, 2005. 270 p. [in Ukrainian] / Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. К: Наукова думка, 2005. 270 с.
 7. Lenivko S.M., Yerchak N.P., Kovalenko V.V., Kirisyuk Yu.V., Boyko E.V. Optimization of the composition of the nutrient medium for the induction of callus formation in the culture of unripe wheat germ. *Cell biology and plant biotechnology: tezisy dokladov conf. of Biological faculty BGU. Minsk, 2013*. P. 192. [in Russian] / Ленивко С.М., Ерчак Н.П., Коваленко В.В., Кирисюк Ю.В., Бойко Е.В. Оптимизация состава питательной среды для индукции каллусообразования в культуре незрелых зародышей мягкой пшеницы. *Клеточная биология и биотехнология растений*: тезисы докладов конф. Биол. фак-та БГУ. Минск, 2013. С. 192.
 8. Mel'nichuk M.D., Novak T.V., Kunakh V.A. Biotekhnolohiia roslyn. K: Polyhraf Konsaltyng, 2003. 520 p. [in Ukrainian] / Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. К: Поліграф Консалтинг, 2003. 520 с.
 9. Satarova T.M. Androgenesis and embryonic culture of corn *in vitro*: dys. ... doctor biol. nauk. Kyiv, 2002. 537 p. [in Ukrainian] / Сатарова Т.М. Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: дис. ... докт. біол. наук. К., 2002. 537 с.
 10. Skaptsov M.V., Balabova D.V., Kutsev M.G. Optimization of media for the cultivation of plants *in vitro* on the example of sorrel aquatic *Rumex aquaticus* L. *Agricultural biology*. 2014. № 1. P. 32–35. [in Russian] / Скапцов М.В., Балабова Д.В., Куцев М.Г. Оптимизация сред для культивирования растений *in vitro* на примере щавеля водного *Rumex aquaticus* L. *Сельскохозяйственная биология*. 2014. № 1. С. 32–35.
 11. Solovyh N.V., Muratova S.A. Induction of morphogenesis from somatic tissues of plants of the genus *Rubus*. *Bulletin Michurinsky GAU*. 2010. № 2. P. 104–110. [in Russian] / Соловьев Н.В., Муратова С.А. Индукция морфогенеза из соматических тканей растений рода *Rubus*. *Вестник Мичуринского ГАУ*. 2010. № 2. С. 104–110.
 12. Kudryashova O.A., Volotovich A.A., Vasylevskaya T.I., Varavina N.P., Rupasova Zh.A., Khripach V.A. Effects of 24-epibrassinolide on *in vitro* micropropagation of high bush blueberry. *Russ. J. Plant Physiol.*. 2012. Vol. 59, № 4. P. 586–593. doi: 10.1134/S1021443712040073.
 13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15, (3). P. 473–497.

OLIYNIK T. M.¹, KOVBASENKO R. B.², DMITRIEV A. P.², DULNIEV P. G.³

¹ *Institute of Potato Studies, Natl. Acad. Agrar. Sci. Ukraine, Ukraine, 07853, Kyiv region, Borodyansky district, Nemishayev town, Chkalov str., 22*

² *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering Natl. Acad. Sci. Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 148*

³ *V.P. Kuhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, Natl. Acad. Sci. Ukraine, Ukraine, 034276, Kyiv, Kharkiv highway, 50*

POSSIBLE REPLACEMENT OF CYTOKININS AND AUXINS IN CULTURE *IN VITRO*

Aim. To perform an analysis of the effectiveness of our proposed modification of the classical MS medium in which auxin and cytokinin are replaced by derivatives of the class of tetrahydrothio-fendioxide and pyridine. **Methods.** In this study, the work with cell culture *in vitro*, in particular aseptically sprouting of seeds, microclonal reproduction, callusogenesis and initiation of various types of morphogenesis was carried out according to known techniques. Two varieties of potatoes (*Slovyanka*, *Lugovskaya*) and two varieties of tomato (*Lagidny*, *Bobrytsky*) were used to induce somaclonal variability. **Results.** The ability of preparations of tetrahydrothiophenedioxide and pyridine derivatives to perform the function of auxins and cytokinins in the MS medium in the callusogenesis of Solanaceae cultures *in vitro* was established. **Conclusions.** It has been shown that with the use of the new generation drug (tetrahydrothiophenedioxide-pyridine), as a substitute for auxin and cytokinin in the MS medium, the growth of callus tissue is even increased. The production of the pilot batch of this substitute proved to be much cheaper than synthesis or the purchase of phytohormones.

Keywords: modification of MS medium, phytohormones substitute, tetrahydro-thiophenedioxide-pyridine, potato, tomato.