

УДК: 602.6:582.711.713:575.16

Шита О.П., здобувач

Білоцерківський національний аграрний університет

oksanashita@ukr.net

ДЕТЕРМІНАЦІЯ ОНТОГЕНЕЗУ ПЕРВИННИХ ЕКСПЛАНТІВ *PRUNUS DULCIS* (Mill.) D.A.Webb. ЗА НЕПРЯМОГО МОРФОГЕНЕЗУ

В даній роботі здійснено оцінювання впливу різних концентрацій речовин із цитокініноювою активністю на калюсогенез первинних експлантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. на живильному середовищі NAM за непрямого морфогенезу.

Ключові слова: мигдаль, *in vitro*, дедиференціація, цитокініни, фітогормони.

Shyta O.P., acquirer

Bila Tserkva National Agrarian University

oksanashita@ukr.net

DETERMINATION OF ONTOGENESIS OF PRIMARY *PRUNUS DULCIS* (Mill.) EXPLANTS D.A. Webb. BY INDIRECT MORPHOGENESIS

In this work, the influence of different concentrations of substances with cytokinin activity on the callusogenesis of primary explants of *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb was assessed. on NAM nutrient medium during indirect morphogenesis.

Key words: almond, *in vitro*, dedifferentiation, cytokinins, phytohormones.

Мікроклональне розмноження, культура меристем (оздоровлення) та процеси диференціації і дедиференціації тісно пов'язані як в сучасному розсадництві так і селекції. Не виключенням є і роботи з мигдалем [1, 2]. Калюсні культури актуальні як напрям, що є зручним для маніпуляцій, як шляхом трансгенезу, соматичної гібридизації так і для глибокого дедиференціювання *in vitro* рослинного матеріалу ботанічних видів в котрих на перших етапах мікроклонального розмноження прямий морфогенез в первинних експлантів є проблематичним. Припускаємо, що глибока дедиференціація в калюсній культурі є одним із основних факторів дерепресування ювенільних генів [3, 4, 5].

Спонтанне калусоутворення однак із ознаками вітрифікації нами при введенні в асептичні умови отримано на живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга (рис. 1.). Калюси (5-8 %) на цьому середовищі в первинних експлантів утворювалися за додавання цитокініну БАП (1,0 мг/л) та ауксину індолілмасляної кислоти (1,0 мг/л). Кількість таких експлантів зростала за постійного (три і більше пасажувань) вирощування на цьому середовищі. Проте калюси були щільними й не морфогенними, їх поверхні змінювали колір із інтенсивно зеленого до коричневого і в наступних пасажах гинули (рис. 2). Порівняно із іншими середовищами (QL, DKW, NAM, NRM) MS має високий уміст мінеральних елементів і особливо солей нітрогену.

Оскільки середовище MS за нашим припущенням із за високого умісту мінеральних та органічних компонентів (4405.19 мг/л за [6]) проявляло фітотоксичний вплив (вітрифікація, фенолоутворення, розеточність) то подальші дослідження проводили на середовищі NAM.

Кількість первинних експлантів із ознаками калусоутворення зростала зі збільшенням як цитокінів окремо, ауксинів окремо та і їх комбінацій (табл. 1). Збільшення умісту як окремо цитокініну бензиламінопурину (5,0 мг/л) або ауксину індолілмасляна кислота (5,0 мг/л) так і їх комбінація (БАП 5,0 мг/л ІМК 5,0 мг/л) стимулювало як кількісно так і якісно на калусогенез. На варіанті із БАП 5,0 мг/л і ІМК 1,0 мг/л кількість експлантів із калусами в розрізі сортів становила всього ($\Sigma_{\text{всього}}$) 24-39 % із них морфогенні 7-12 %. Збільшення умісту ІМК до 5,0 мг/л за відповідної кількості БАП зростав відсоток загальної кількості первинних експлантів із калусами, однак відсоток морфогенних калусів знизилася до 4-11 %. При великій кількості ІМК та 1,0 мг/л БАП $\Sigma_{\text{всього}}$ становило 22-27 % при 1-5 % морфогенних.



Рис. 1. Спонтанне калусоутворення та вітрифікація первинних експлантів мигдалю на середовищі MS, сорт Луїза

Рис. 2. Щільні з низькою морфогенною активністю калуси

Таблиця 1. Вплив концентрацій бензиламінопурину та індолілоцтової кислоти на калусогенез в первинних експлантів на живильному середовищі NAM, %

Сорт	БАП 1,0 ІМК 1,0		БАП 5,0 ІМК 1,0		БАП 1,0 ІМК 5,0		БАП 5,0 ІМК 5,0	
	* $\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$
Е5 Борозан	0	0	27	11	23	3	49	9
М41 Алекс	0	0	24	7	22	3	63	5
Джорджия	0	0	31	9	24	1	66	4
Луїза	1	0	39	12	27	5	71	11

* скороченням " $\Sigma_{\text{всього}}$ " та $\Sigma_{\text{морф}}$ " – кількість калусів всього та морфогенних у відсотках

Для збільшення кількості морфогенних калусів проведено підбір речовин з цитокініноюю активністю (таб. 2) на фоні ауксину ІМК в кількості 1,0 мг/л.

Кінетин 5,0 мг/л порівняно з БАП 5,0 мг/л індукував утворення в більшій кількості первинних експлантів калусоутворення (41-46 % проти 23-38 %) з них також була більша кількість морфогенних калусів, від 33 до 41 % при 7 - 13 на варіанті із 5,0 мг/л БАП. Припускаємо, що такі концентрації БАП є фітотоксичними, тоді як кінетин проявляє меншу фітотоксичність навіть за високих концентрацій [3, 7, 8].

Таблиця 2. Вплив концентрацій речовин із цитокініноювою активністю на калюсогенез в первинних експлантів на живильному середовищі NAM, %

Сорт/ кількість речовини, мг/л	БАП 5,0		БАП 1,0 К 4,0		К 5,0		БАП 1,0 + К 2,0 АС 2,0	
	* $\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$
Е5 Борозан	26	13	51	29	44	33	38	36
М41 Алекс	23	7	44	33	41	37	31	28
Джорджия	33	10	49	21	46	36	33	30
Луїза	38	12	69	27	48	41	41	38

* скороченням “ $\Sigma_{\text{всього}}$ ” та $\Sigma_{\text{морф}}$ ” відповідає кількість калюсів всього та морфогенних у відсотках; К - кінетин; АС - аденін сульфат.

Неоднаковий вплив синтетичних аналогів гормонів одного й того ж класу на морфогенез пов’язаний із багатовекторністю дії природних гормонів. Це зокрема стосується й цитокінінів. Їх різнобічний вплив проявляється завдяки здатності перебувати та діяти в різних формах.

Найбільша загальна кількість експлантів із калюсами була на варіанті БАП 1,0 мг/л разом із 4,0 мг/л кінетину: від 49 до 69 %. Проте цей варіант поступався за кількістю морфогенних калюсів: 21 - 33 %.

Децю нижчу загальну кількість калюсів отримано при застосуванні комбінації з трьох речовин: 31 - 41 % та від 28 до 38 %. Тобто кількість всього калюсів була середньою по досліді але серед цих калюсів найбільший відсоток морфогенних. Калюси на цьому відрізнялися (рис. 3), як за кольором (порівняно світліші) та щільністю найбільш пухкі серед інших варіантів.

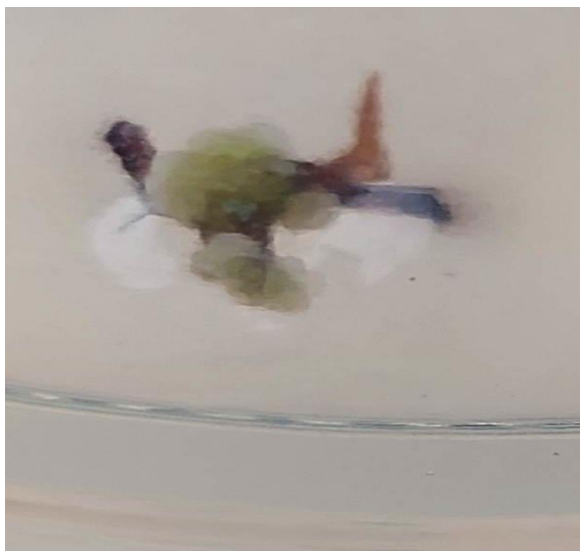


Рис. 3. Пухкі калюси на середовищі із БАП 1,0 + К 2,0 АС 2,0 (мг/л)

Вважаємо, що причинами високої морфогенності такої комбінації є різні форми біологічно активних речовин аналогів природного цитокініну. Також аденін є вихідною речовиною для синтезу природного фітогормону (рис. 4). Рослинний організм в такому випадку синтезує саме ту кількість яка йому необхідна і не є у фітоксичних кількостях [3, 4, 9].

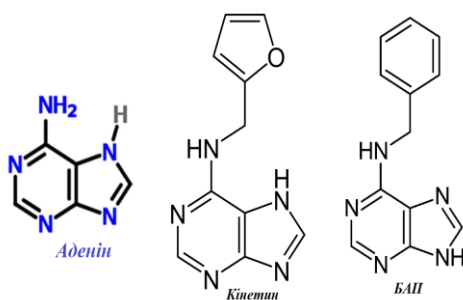


Рис. 4. Подібність аденіну і кінетину та БАП

Для збільшення ефективності морфогенезу калюсних культур дедиференційовану клітинну масу відокремлювали від первинних експлантів і розмножували з додаванням БАП 1,0 мг/л + кінетину 2,0 мг/л, аденін сульфату 2,0 мг/л. При досягненні необхідної кількості калюсів їх переносили на середовище із 1,0 мг/л кінетину, 1,0 мг/л аденін сульфату, 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти та гібереліном з різними варіантами концентрацій (табл. 3). Кількість гібереліну (у формі гіберелової кислоти ГК₃) впливала на морфогенність як в першому так і в другому пасажах. Порівняно з безгібереліновим контролем за першого пасажу варіанти 1,0 мг/л, 1,5 мг/л, 2,0 мг/л за кількістю калюсів в яких розпочалося закладання органів (візуально було видно формування розеток з листових пластинок) обумовлювали зростання цього показника 29-39 до 73-84 %. Додавання ГК в кількості 0,5 мг/л за впливом на морфогенез не відрізнялося від контролю.

Таблиця 3. Вплив концентрацій гібереліну на морфогенез в калюсів мигдалю, %

Сорт	контроль		ГК 0,5 мг/л		ГК 1,0 мг/л		ГК 1,5 мг/л		ГК 2,0 мг/л	
	Σ ₁	Σ ₂	Σ ₁	Σ ₂	Σ ₁	Σ ₂	Σ ₁	Σ ₂	Σ ₁	Σ ₂
Е5 Борозан	35	11	38	41	78	82	79	78	74	12
М41 Алекс	29	25	30	42	73	85	84	82	36	16
Джорджия	30	14	28	45	75	89	74	79	39	13
Луїза	39	19	37	41	81	94	78	86	48	18

* скороченням “Σ₁” та Σ₂” відповідає кількість морфогенних калюсів перший пасаж та другий пасаж у відсотках; ГК - гіберелова кислота.

Хід процесу непрямого морфогенезу первинних експлантів зображено на рис. 5.

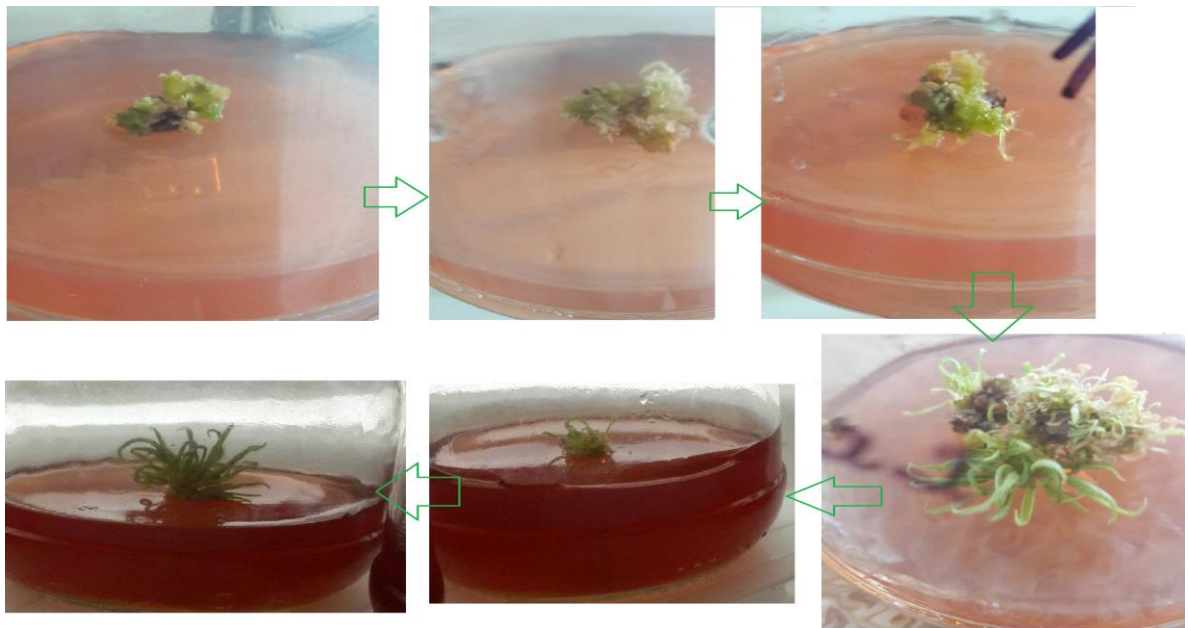


Рис. 5. Морфогенез калюсу мигдалю

Висновок. Розроблено елементи технології отримання морфогенних калюсів мигдалю. За першого пасажу відмінність між варіантами з концентраціями 1,0 мг/л, 1,5 мг/л, та 2,0 мг/л була в межах похибки. За другого пасажу виявлено фітотоксичний вплив концентрації в 2,0 мг/л. Це проявлялося в зміні зеленого на біло-жовтий колір та втратою води як недиференційованими тканинами так і органами які почали формуватися. Варіанти 1,5 мг/л, і 2,0 мг/л як за першого так і другого пасажу між собою не відрізнялися.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Mehra, A., & Mehra, P. N. (1974). Organogenesis and Plantlet Formation In vitro in Almond. Botanical Gazette, 135(1), 61–73. <http://www.jstor.org/stable/2473987>
2. Мацкевич В.В., Кімейчук І.В., Мацкевич О.В., Шита О.П. Світовий досвід, перспективи в Україні розмноження фундука та мигдалю // Агробіологія = Agrobiology: збірник наукових праць. № 1 (171) 2022. Білоцерківський національний аграрний університет. Біла Церква: БНАУ, 2021. с.: 179-191.
3. Мацкевич В.В. Мікроклональне розмноження видів рослин *in vitro* та їх постасептична адаптація. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису: дис. д-ра с.-г. наук: 06.01.05. Суми, 2020. 478 с.
4. Терек О. І. Ріст і розвиток рослин: навч. посібник/О. І. Терек , О. І. Пацула . – Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2011. – 328 с.
5. Геноміка: навч. посіб. / В.М. Попов , Т.А. Долгова, С.В. Лиманська та ін. – Харків: ХНАУ, 2020. – 104 с.
6. http://brochure.duchefa-biochemie.com/Duchefa_catalogus_2010_2012/docs/Duchefa_catalogus_2010_2012.pdf
7. Подгасцький А.А., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Скрипченко Н.В., Кравченко Н.В. Трофічні та гормональні детермінанти онтогенезу *Actinidia chinensis var, deliciosa* (а. Chev.) *in vitro* на етапі мультиплікації . East European Scientific Journal #10(62), 2020 part 1. P 17-24.
8. Мацкевич, В. В. Удосконалені методи оздоровлення картоплі від вірусів та використання отриманого матеріалу в первинному насінництві. дис. к. с.-г. наук: за спеціальністю 06.01.14–насінництво.–Київ, 2004.–153 с, 2004.
9. Веденичова Н.П., Косаківська І.В. Цитокініни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання. – Київ: Наш формат, 2017. – 200 с.