

Івченко Т.В., кандидат с.-г. наук
Гарт О. Ю., аспірант
Інститут овочівництва і баштанництва НААН

РЕГЕНЕРАЦІЙНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ЕКСПЛАНТАТІВ ПЕРЦЮ СОЛОДКОГО (*CAPSICUM ANNUM L*)

Дослідження проведено з використанням експлантатами гіпокотелів і сім'ядолей 7-денних стерильних проростків. Регенерацію пробіркових рослин здійснено шляхом прямого органогенезу з індукованої на середовищі МС з різними концентраціями ауксинів і цитокинінів калюсної тканини. Найбільший відсоток морфогенного калюсу одержано з сім'ядолей, культивованих на середовищі модифікованому БАП – 5 мг/л, ІО_{ДК} - 0,5 мг/л; та з гіпокотелів на середовищі з БАП – 4 мг/л, ІО_{ДК} – 2 мг/л. Підрощування індукованих новоутворень здійснювали на середовищі, доповненому БАП - 1 мг/л, ГК₃ - 2 мг/л. Різогенез у рослинерегенерантів одержано на середовищі, доповненому 0,5 мг/л ІО_{ДК}.

Ключові слова: сім'ядолі, гіпокотелі, генотип, поживне середовище, укорінення, морфогенез, *in vitro*

Вступ. Перець солодкий (*Capsicum annum L.*) є однією з найцінніших овочевих культур, площі під якою за останні 30 років постійно збільшуються як у нашій країні, так і всьому світі завдяки смаковим якостям плодів та високому вмісту в них необхідних для організму людини органічних кислот, солей, азотних речовин, цукрів, каротину [1]. Для підвищення конкурентоздатності новостворених сортів і гібридів у провідних селекційних центрах для одержання перспективного селекційного матеріалу активно залучають біотехнологічні методи, такі як соматональна мінливість та генетична трансформація рослин [2, 3]. Соматональна мінливість, що виникає у процесі культивування клітин через умови культивування *in vitro*, може стати важливим джерелом розширення спектра доступної генетичної мінливості, а також дозволяє покращити конкурентоздатність вже створених сортів як за кількісними, так і за якісними ознаками, наприклад такими, як абіотична та біотична стійкість. На відміну від помідора і баклажана, застосування методів культури ізольованих клітин і тканин при роботі з © Івченко Т.В., Гарт О. Ю., 2012.

експлантатами перцю ускладнено, оскільки результативність реалізації тотипотентності його клітин значною мірою обмежена рядом лімітуючих факторів, а різні генотипи цієї культури також мають дуже відмінні показники морфогенезу. Досліджень з визначення ефективних регенераційних систем для застосування на генотипах української селекції досі не проводили. Саме тому *метою* нашої роботи було дослідження особливості калусогенезу і морфогенезу різноманітних первинних експлантатів і генотипів перцю солодкого для використання технології *in vitro* при створенні перспективних у селекції вихідних форм.

Методика досліджень. Дослідження виконували із використанням стандартного біотехнологічного обладнання за загальноприйнятими біотехнологічними методиками [4]. Вихідним матеріалом слугувало насіння перспективних у селекції генотипів - б. к. С1, б. к. С2, б. к. С3, б. к. С4, б. к. С5, б. к. С6. Кількість об'єктів в одному варіанті – 20 шт. Стерилізували насіння у розчині гіпохлориду натрію у концентрації 2:1, експозиція обробки – 15 хв. Після стерилізації насіння промивали 5 разів стерильною водою. Для індукції калусогенезу використали гіпокотелі та сім'ядолі 7-денних стерильних проростків, які висаджували на базове середовище Мурасиге-Скуга (МС) [5], модифіковане різними концентраціями цитокініну БАП, та ауксинів ІО₂К або НО₂К. Контролем використовували безгормональне середовище. Також середовище доповнювали 30 г/л сахарози, 1 мг/л тіаміну, 6 г/л агар-агару, рН його 6,8. Матеріал культивували за температури 20-22°C, фотоперіод 16-год. освітлення, 8 год. темноти при інтенсивності освітлення – 2 тис. люкс. Обліки розвитку калусогенезу здійснювали візуально після кожних 30 днів культивування. Кожний пасаж становив 30 діб. Отримані конгломерати мікропагонів для додаткової диференціації і підрощування пересаджували на середовище, яке містило 1 мг/л БАП та 2 мг/л ГК₃. Укорінення сформованих рослин-регенерантів здійснювали на середовищі МС доповненому ауксинами – 0,5 мг/л ІО₂К та 0,5 мг/л ІО₂К. Розвинені пробіркові рослини висотою 6-8 см, з однією-двома парами справжніх листків та сформованою кореневою системою для первинної адаптації висаджували у горщечки з кокогрунтом, ємністю 100 см³. Первинну адаптацію рослин проводили протягом трьох тижнів у культуральній кімнаті за умов підвищеної відносної вологості повітря (не менше 75 %), при освітленні 5 тис. люкс за 16-годинного фотоперіоду.

Результати досліджень. При розробці регенераційної системи добір первинного експлантату є визначальним у подальшій ефективності біотехнологічного процесу. У ході експерименту виявлено здат-

ність до індукції калюсогенезу як у сім'ядолей, та і у гіпокотелей перцю солодкого. Індукція світло-зеленого первинного калюсу розпочиналась вже через 2 тижні, при цьому інтенсивність і початок проліферації у даних генотипів були різними.

Аналіз ознак, що характеризують здатність перцю солодкого до культивування *in vitro*, виявив певні залежності. Найбільшою інтенсивність розвитку калюсної тканини зафіксовано з сім'ядолей, де ефективність калюсогенезу становила від $25,0 \pm 0,5$ до $95,5 \pm 3,0$ %, а середній діаметр калюсів після чотирьох тижнів культивування дорівнював від $4,3 \pm 0,5$ до $17,9 \pm 0,9$ мм³ залежно від вмісту регуляторів росту у складі поживного середовища (табл. 1).

Дещо нижчі показники ефективності калюсогенезу виявлено при використанні в якості експлантатів гіпокотелів перцю солодкого. Даний показник коливався від $27,4 \pm 1,9$ до $80,0 \pm 2,5$ % при середніх показниках діаметра калюсу від $6,1 \pm 0,7$ до $14,8 \pm 1,2$ мм³. Особливістю використаних експлантатів була здатність до формування калюсів навіть на безгормональному середовищі, що пов'язано з високою ефективністю використання експлантатами частин рослин, а саме - гіпокотелів, які знаходяться на ювенільній фазі розвитку. Одним із визначальних чинників ефективності калюсогенезу є наявність у складі поживних середовищ регуляторів росту. У варіантах з високими концентраціями БАП (3-5 мг/л) відмічено найвищі показники індукції калюсогенезу - 77,9-95,5 %, у поєднанні зі значним відсотком проліферації морфогенних новоутворень. При зниженні у середовищі концентрації БАП до 2 мг/л спостерігали підвищення наростання біомаси до 17,9 мм³, але морфогенних калюсів у цьому варіанті середовища не спостерігалось. Низькі концентрації БАП (1 мг/л) мали і низьку ефективність індукції калюсогенезу. У цих варіантах розвиток калюсної тканини знаходився на рівні контролю.

У індукованих з сім'ядолей і гіпокотелів перцю солодкого калюсів процеси диференціації проходили швидко. Через 3 тижні на поверхні калюсної тканини формувались темно-зелені структури, з яких при наступному культивуванні формувались рослини-регенеранти. Ефективність регенерації визначали через п'ять тижнів після початку культивування, як відношення кількості пагонів довжиною понад 5 мм до загальної кількості експлантатів. Калюс, сформований з сім'ядолей у варіантах із високими концентраціями БАП, забезпечував формування рослин-регенерантів у 24,4-80,5 %. Високі показники морфогенних експлантатів, індукованих із гіпокотелів ($55,7 \pm 1,9$ %) одержано нами

у варіанті середовища, модифікованого БАП (4 мг/л) та ІО_цК (2 мг/л). У варіанті, модифікованому БАП – 1 мг/л та НО_цК – 0,5 мг/л також спостерігався достатньо високий показник морфогенезу – 65,7 %. Але через факт, що у цьому варіанті розвиток морфогенезу відбувався виключно у напрямкі різогенезу, а з калюсної тканини, індукованої з гіпокотелів, регенерувалися лише чисельні корінці, цей варіант середовища не можна рекомендувати для застосування регенераційним середовищем. У інших варіантах калюс із гіпокотелів мав дуже щільну структуру і при подальшому культивуванні виявився неморфогенним.

Використані у досліді генотипи виявили різну реакцію на культивування в умовах *in vitro* (табл. 2). Невисоку регенераційну здатність мав генотип б. к. С₄ (47,7 %) та С₅ (57,8), а найбільшу – б. к. С₂ (80 %). З калюсів генотипу б. к. С₃ регенерацію отримати взагалі не вдалося, що вимагає проведення додаткової модифікації середовища для цього генотипу. Отримані результати говорять про різний морфогенетичний потенціал генотипів перцю солодкого. Через генетичні відмінності у балансі ендогенних гормонів у використаних генотипів при культивуванні в умовах *in vitro* відбувались відмінності як у диференціації тканин, так і наступній регенерації з них рослин. З цієї причини, при культивуванні на поживних середовищах із різною концентрацією і комбінацією регуляторів росту відбуваються відмінності у регенераційній здатності генотипів перцю солодкого, бо залежно від сортових особливостей рослин їх потреби в тих, чи інших сполуках неоднакові. Кількість індукованих рослин-регенерантів на один калюс у різних генотипів також відрізнялась, оскільки за даною ознакою вплив генотипу також був визначальним. Калюси генотипів б. к. С₁, б. к. С₂, та б. к. С₆ характеризувались найбільшою кількістю індукованих пагонів - 4,90±0,3, 3,5±0,09 та 3,3±0,1 шт. на 1 експлантат відповідно. У калюсів генотипів б. к. С₄ та С₅ цей показник був на рівні 1,37±0,2 та 1,17±0,08 шт. регенерантів.

У результаті проведення першого етапу досліду з морфогенної калюсної тканини методом прямого органогенезу, отримано рослини-регенеранти перцю солодкого п'яти генотипів, які додатково підрощували в умовах *in vitro* протягом двох пасажів.

Відомо, що коренеутворення, або різогенез – один із найбільш складних етапів у культурі *in vitro* перцю солодкого, регенеранти якого мають низьку адаптивну здатність [6]. Тому сформовані мікропагони для укорінення висаджували на середовище, доповнене ауксинами (ІО_лК та ІО_цК). Дослідження свідчать, що найбільшу кількість укори-

нених пагонів (61,9 %) забезпечило поживне середовище, модифіковане 0,5 мг/л ІО_лК (табл. 3). Практично всі регенеранти на цьому середовищі сформували корінці, що дозволило нам провести їх успішну адаптацію. Укорінення на середовищі, модифікованому 0,5 мг/л ІО_цК, забезпечило значно нижчі показники ефективності різогенезу – 8,1%. Сформовані у цьому варіанті мікропагони за показником середньої довжини коренів також були невисокими – 2,82±0,1, тоді як на середовищі з використанням для укорінення ІО_лК цей показник дорівнював 8,53 ±0,2 см, що дозволяє нам рекомендувати останню для укорінення рослин-регенерантів перцю солодкого цю концентрацію.

Одержані в результаті досліджень укорінені рослини-регенеранти перцю солодкого генотипів б. к. С₁, б. к. С₂, б. к. С₄, б. к. С₅, б. к. С₆ адаптували та висадили у скляну теплицю для подальшого вирощування. Під час вегетаційного періоду догляд за одержаними біотехнологічними методами рослинами R₀ здійснювали у відповідності із загальноприйнятими для культури технологічними заходами. Це дозволило нам за 150 діб вегетації одержати з пробіркових рослин перцю солодкого стиглі плоди з кондиційним насінням, яке буде використано у подальших дослідженнях.

Висновки. Оцінка морфогенетичного потенціалу і регенераційної здатності сім'ядолей і гіпокотелів із шести генотипів перцю солодкого виявила суттєву залежність цих показників від складу індукційних середовищ та генотипу.

Бібліографія.

1. Agra W. Plant Regeneration in Tissue cultures of Pepper (*Capsicum annuum L.*) / W. Agra., N. Chandra, S. Kothari // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1989. №16. P.47-55.
2. Christopher, T. Effect of Genotype, Explant and Medium on *in vitro* Regeneration of Red pepper /T. Christopher, M. Rajam // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1996. № 46. P. 245-250.
3. Sanatombi K. Micropropagation of *Capsicum annuum L.* / K. Sanatombi, G. Sharma // Not. Bot. Hort. Agrobot. – 2007. V. 35, № 1. P. 23-27.
4. Методика досліджень в культурі ізольованих тканин овочевих рослин / [В. П. Мірошніченко, О. Ф. Сергієнко, Т. В. Івченко, С. А. Гончарова, С. І. Кондратенко, Н.О. Баштан] – Мерефа: ІОБ УААН. – 2004. – 25 с.

5. Murashige T. A revised medium for rapid grown and bioassay with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – 15. – P. 473 – 497.

6. Anel K. Multiple Shoot Induction and Plant Regeneration from Nodal Explants of Peppers (*Capsicum annuum L.*) // *Islan J. Exp. Biol. Sci.*- 2011. – V. 2 (3). – P. 517-520.

Т.В. Ивченко, О. Ю. Гарт

Регенерационный потенциал эксплантатов перца сладкого (*Capsicum annum L.*).

Резюме. Исследование проведено с использованием гипокотилей и семядолей семи дневных стерильных проростков в качестве эксплантатов. Регенерация пробирочных растений осуществлена путем прямого органогенеза из индуцированных на среде МС с различными концентрациями ауксинов и цитокининов калусов. Наибольший процент морфогенного калуса получен из семядолей, культивируемых на среде модифицированной БАП - 5 мг/л, ИУК - 0,5 мг/л, а из гипокотилей на среде с БАП - 4 мг/л и ИУК - 2 мг/л.

T.V. Ivchenko, O. Yu. Gart

Regeneration potential of seedling explants of pepper (*Capsicum annum L.*).

Summary. A study conducted with hypocotyls and cotyledon of pepper as explants for regeneration on MS medium supplemented with different concentration and combination of auxins and cytokinins. The highest callus formation and regeneration was induced from cotyledon in a combination of BAP (5,0 mg/l) with IAA (0,5 mg/l) and hypocotyls in a combination BAP (4 mg/l) with IAA (2 mg/l).

1. – Вплив різних концентрацій регуляторів росту на калюсогенез і морфогенез з сім'ядолей і гіпокотелів перцю солодкого, 2012 р.

Експлантат	Вміст регуляторів росту, мг/л	Калюсогенез		Отримано морфогенних калюсів, %
		Ефективність, %	Середній діаметр калюсів, мм ³	
Сім'ядолі	МСб/г(контроль)	25,3	4,3±0,5	0
	БАП – 1 Ю _ц К -0,5	80,0	10,3±0,9	0
	БАП – 2 Ю _ц К -0,5	88,4	17,9±0,9	0
	БАП – 3	95,5	11,5±1,9	24,4
	БАП – 4 Ю _ц К – 2	77,9	14,8±1,0	44,5
	БАП – 5 Ю _ц К -0,5	90,1	15,2±1,2	80,5
Середнє		76,2	12,3±1,1	24,9
Гіпокотелі	МСб/г(контроль)	27,4	6,6±0,7	0
	БАП – 1 Ю _ц К -0,5	19,0	6,1±0,6	65,7
	БАП – 2 Ю _ц К -0,5	26,5	11,2±0,9	0
	БАП – 3	15,0	7,4±0,8	0
	БАП – 4 Ю _ц К - 2	80,1	14,8±1,2	55,7
	БАП – 5 Ю _ц К -0,5	55,0	10,1±1,1	0
Середнє		37,2	8,4±0,7	20,2
НІР ₀₅		15,5		

2. - Ефективність регенерації генотипів перцю солодкого

Генотип	Морфогенетичний потенціал, %	Кількість пагонів на калюс, шт.
Б. к. С ₁	70,4±0,5	4,90±0,3
Б. к. С ₂	80,0±0,6	3,5±0,09
Б. к. С ₃	0	0
Б. к. С ₄	47,7±0,8	1,37±0,2
Б. к. С ₅	57,8±0,8	1,17±0,08
Б. к. С ₆	62,3±0,7	3,3±0,1

3. - Вплив ауксинів на формування кореневої системи у пробіркових рослин перцю солодкого, 2012 р.

Генотип	Концентрація ауксинів, 0,5 мг/л			
	ІО _л К		ІО _ц К	
	Різогенез, %	Середня довжина кореня, см	Різогенез, %	Середня довжина кореня, см
Б. к. С ₁	75,4	10,00±0,11	0	0
Б. к. С ₂	66,7	8,50±0,34	25,5	7,40±0,2
Б. к. С ₃	51,6	6,80±0,19	0	0
Б. к. С ₄	60,7	9,30±0,27	15,0	6,7±2,6
Б. к. С ₅	55,5	8,04±0,26	0	0
Б. к. С ₆	61,9	8,53±0,2	8,1	2,82±0,22