

С.І. Кондратенко, кандидат біологічних наук,
О.В. Сергієнко, кандидат с.-г. наук,
Л.О. Радченко, молодший науковий співробітник,
Л.Д. Солодовник, молодший науковий співробітник,
Інститут овочівництва і баштанництва НААН України.
П.Г. Дульнев, кандидат хімічних наук,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

**ДІЯ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ, ПОХІДНИХ ПІРИДИНУ
НА ФОРМУВАННЯ АНДРОГЕННИХ НОВОУТВОРЕНЬ
В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ ОГІРКА *IN VITRO***

Опубліковано результати випробувань біологічно-активних сполук, похідних піридину для ініціації росту андрогенних новоутворень в культурі пиляків огірка in vitro. Доведено, що додавання регулятора, похідного піридину - ДГ-475 у композиції з еталонними регуляторами 2,4-Д і кінетіном до складу індукційного середовища В5 призводить до посилення росту калюсу андрогенного походження. Встановлено суттєвий вплив на ініціацію росту проембріонального калюсу в культурі ізольованих пиляків огірка in vitro попередньої обробка донорних рослин водними розчинами регуляторів росту – НОК або регуляторів, похідними піридину – ДПР-777, Д-777КИ, Д-777В115 у діючій концентрації – 100 мг/л.

Ключові слова: огірок, культура пиляків *in vitro*, обробка рослин, проембріональні новоутворення, регулятори росту.

Вступ. Останнім часом у вітчизняних селекційних установах набули поширення розробки по створенню потрібних гібридів огірка ніжинського сорто типу [1]. Одним з батьківських компонентів потрібних гібридів є двостатевоквіткові складні материнські форми (СМФ), які отримують від гібридизації гіноциїної лінії з гермафродитним

© Кондратенко С.І., Сергієнко О.В., Радченко Л.О., Солодовник Л.Д. Дульнев П.Г., 2013.

аналогом або з гермафродитноквітковою формою. Складна материнська форма містить майже 100% фенотипово жіночих рослин, тому є перспективним вихідним матеріалом для гібридної селекції огірка за будь-яким напрямком використання [2, 3]. Якщо для генетичної стабілізації цих форм використовувати традиційний метод інбридингу, то тривалість цього процесу може сягати 5-6 років. Для подолання цієї проблеми доцільно використовувати сучасні біотехнологічні методи експериментальної гаплоїдії, які дозволяють за значно скороченим часом, на протязі одного року, одержувати генетично стабільні СМФ огірка шляхом переведу їх на рівень диплоїдних гомозигот. Зокрема, метод культури ізольованих пиляків *in vitro* дозволяє отримувати дигаплоїди шляхом андрогенезу [4]. Суть цього генетичного явища полягає в тому, що частина молодих мікроспор у культурі *in vitro* виявляється не здатною до нормального перетворення у зрілий пилок, а редиференціюється, багатократно ділиться і утворює або калос, або ембріоїди. У гаплоїдному калосі є можливість індукувати утворення *de novo* бруньок або вторинних ембріоїдів, з яких у подальшому можна отримувати гаплоїдні рослини [4-9]. Іншим суттєвим заходом, здатним підвищити вихід проембріональних новоутворень в культурі пиляків *in vitro* є використання різних стресових факторів на рослини-донори пиляків. Зокрема, попередня їх обробка надмірно високими дозами фітогормональних регуляторів може ініціювати зміни ендогормонального статусу і спонукати, тим самим, опосередкований перехід до аномального розвитку мікроспор, як передумови до їх подальшої редиференціації після введення ізольованих пиляків в культуру *in vitro*.

Мета досліджень. Визначити регуляторну дію хімічних сполук з ряду піридинів на здатність ініціювати напрямок розвитку мікроспор огірка за різних умов впливу – як регуляторів росту в культурі ізольованих пиляків *in vitro* та як діючих стресових факторів для рослин огірка, які є донорами пиляків для введення в культуру *in vitro*.

Методика досліджень. У досліді, де біологічно-активні речовини випробувалися у складі індукційного живильного середовища донорами пиляків використовувалися селекційно-цінні генотипи огірка, які є вихідними формами зі створення складних материнських форм селекції Інституту овочівництва і баштанництва НААН.

Процедура введення в асептичні умови вирощування ізольованих пиляків огірка передбачала наступні етапи.

1. Відокремлення від рослин огірка бутонів і їх поверхнева стерилізація в асептичних умовах шляхом поступового занурення у 70% розчин етанолу на 30 сек., а потім на 20 хв. у побутовий засіб для стерилізації “Domestos”.

2. Після процедури стерилізації промивання бутонів трьома порціями стерильної дистильованої води для усунення з їх поверхні залишків агенту стерилізації.

3. Виділення з простерилізованих бутонів під бінокелем в асептичних умовах ламінарного боксу пиляків і їх перенесення на індукційне живильне середовище B5 у модифікації Келлера, яке, згідно літературних даних є придатним для одержання гаплоїдних ембріодів в культурі пиляків у ряду хрестоквітних видів рослин [5].

За біологією, рослини огірка мають 5 пиляків у чоловічій квітці, 4 з них попарно зрощені. Пиляки висаджували на агаризовані середовища об'ємом 5-6 мл у скляні бюкси розміром 2x3 см і закривали стерильною фольгою. У кожен бюкс висаджували по 20 пиляків від 3-4 бутонів. Повторність висадження пиляків на середовище певного генотипу 5-ти кратна (100 пиляків) для кожного варіанту досліду. Протягом перших 40 діб ізольовані пиляки культивували у культуральній кімнаті в умовах темряви, після чого проводили фенологічні спостереження та реєстрацію різних проявів андрогенних новоутворень на їх поверхні, згідно запропонованих методичних рекомендацій [5]. У подальшому культивовані пиляки переносили на розсіяне світло, спостереження за формуванням андрогенних новоутворень проводили через кожні 15 діб, остаточні статистичні обрахунки проводилися після двомісячного культивування.

У дослідах по індукції росту і формуванню андрогенних новоутворень *in vitro* використовувався статистичний показник – “частота формування калюсуних клонів”, який розраховували як співвідношення кількості утворених зон росту на поверхні культивованих пиляків до їх загальної кількості, виражену у процентах.

Результати досліджень. З метою посилення відгуку до андрогенезу в культурі пиляків *in vitro* в 2007 році був закладений дослід по попередній обробці донорних рослин огірка високими концентраціями регуляторів росту, як стресорами, здатними змінити

ти у мікроспор шлях розвитку з гаметофітного на спорофітний. Доведено, що високими андрогенетичними потенціями володіють мікроспори, що мають змінений, аномальний розвиток [4, 9]. З метою посилення відхилень у їх розвитку при культивуванні пиляків на індукційному живильному середовищі донорні рослини огірка різних генотипів обробляли водними розчинами регуляторів росту – НОК (нафтилоцтова кислота) і 2,4-Д, а також біологічно-активними речовинами, похідними піридину – ДПР-777, ДГ-777, Д-777В115 та Д-77КИ у концентрації 100 мг/л. Обробку розпочинали після висадки розсади огірка у ґрунт на початку травня в умовах скляної теплиці у фазі 3-5 справжніх листків і в подальшому обробку повторювали через кожні 10 діб. Контроль – обробка водою. Повторність обробки для кожного випробуваного препарату була 5-ти кратною. Для виділення пиляків використовувалися бутони чоловічих квіток огірка розміром до 5 мм. Об'єктами досліджень були наступні селекційно-цінні форми огірка: К-50295, К-50296, К-53212, К-53428, К-53451.

Для культивування ізольованих пиляків використовувалося середовище В5, доповнене 0,2 мг/л 2,4-Д та 0,2 мг/л кінетину.

У процесі виконання біотестів було виявлено різну інтенсивність росту андрогенного калюсу на поверхні культивованих пиляків залежно від генотипу огірка та виду випробуваної речовини. У таблиці 1 наведено зведені дані по проведеному досліді. Як засвідчили одержані результати, негативною дією на ріст і формування репродуктивних органів позначилася попередня обробка рослин регулятором 2,4-Д практично у всіх відібраних селекційно-цінних форм огірка. Відносно контролю (обробка рослин водою), дія 2,4-Д призводила до зменшення інтенсивності морфогенетичних процесів в культурі пиляків *in vitro* в 1,49-2,56 рази у генотипів К-50295, К-50296, К-53212, а у генотипів К-53451 і К-53428 спостерігалася повна відсутність ростових процесів. Серед еталонних регуляторів високі морфогенетичні потенції у культивованих пиляків виявив регулятор ауксинової дії – НОК. За умов обробки цим регулятором донорних рослин, в культурі пиляків відмічено суттєве збільшення формоутворюючих процесів, а саме частота формування андрогенного калюсу зростала у 1,26-3,35 рази.

Перспективними речовинами для застосування у якості регуляторів росту, що посилюють морфогенетичні процеси, згідно одержаних результатів, можна зазначити препарати Д-77КИ, ДПР-777 та Д-777В115. За умов їх застосування відмічено

збільшення інтенсивності калюсоутворення в культурі пиляків огірка у всіх відібраних селекційно-цінних форм. Зокрема, при застосуванні препарату Д-77КИ частота формування калюсних клонів в культурі пиляків *in vitro* становила 4,01-17,82 %. Аналогічно, при застосуванні ДПР-777 вищевказаний статистичний показник варіював в межах 1,12-9,51 %, а при використанні Д-777В115 – 3,45-13,46 %.

Обробка донорних рослин регуляторами НОК, Д-77КИ, ДПР-777 та Д-777В115 сприяла відгуку до андрогенезу у генотипу К-53451 на рівні формування калюсних клонів з частотою 1,12-4,01 %, тоді як при звичайному культивуванні без попередньої обробки донорних рослин випробуваними речовинами, пиляки огірка цього генотипу не утворювали калюс. Серед досліджених біологічно-активних речовин дія препарату ДГ-777 варіювала залежно від генотипу, за ефективністю цей препарат поступається еталонному – НОК в разі використання на генотипах огірка К-50295, К-50296, К-53212 та К-53451.

В цілому характеризуючи дію регуляторів росту, похідних піридину відносно еталонних слід відмітити високу біологічну активність препаратів Д-777В115 та Д-77КИ, які залежно від генотипу огірка ініціювали ростові процеси в культурі ізольованих пиляків як на рівні НОК, так і зі статистично достовірним перевищенням значення частоти формування калюсних клонів (табл. 1).

У варіанті досліду з випробування біологічно-активних речовин в культурі ізольованих пиляків огірка *in vitro*, як об'єкти досліджень використовували селекційно-цінні генотипи: К-49126, К-48413, К-49079, К-53515, К-53658, К-50066, К-50296, К-607, які вирощувалися в умовах скляної теплиці протягом 2008-2009 років. Для індукції проембріональних новоутворень у культивованих ізольованих пиляків огірка за фітогормональний контроль використовувалася композиція еталонних регуляторів росту 0,2 мг/л 2,4-Д та 0,2 мг/л кінетину, згідно рекомендацій наведених в роботі [5]. У досліді проводилася оптимізація індукційного середовища В5 за вмістом регуляторів росту, похідних піридину. Зокрема, випробувалися наступні препарати - ДПР-827775, Д-46103 та ДГ-475 за схемою наведеною у таблиці 2.

1. – Рівень морфогенезу в культурі пиляків огірка *in vitro* залежно від попередньої обробки донорних рослин випробуваними біологічно-активними речовинами, 2007 р.

№ п/п	Біологічно-активна речовина	Селекційно-цінні форми*											
		К-50295		К-50296		К-53212		К-53451*		К-53428			
		Частота формування каллосу, %	Приріст показника до конт-ролю, %	Частота формування каллосу, %	Приріст показника до конт-ролю, %	Частота формування каллосу, %	Приріст показника до конт-ролю, %	Частота формування каллосу, %	Приріст показника до конт-ролю, %	Частота формування каллосу, %	Приріст показника до конт-ролю, %		
1.	Обробка водою (контроль)	3,84	-	3,12	-	1,52	-	0	-	2,61	-	-	-
2.	НОК (ета-лон 1)	16,7	+12,86	7,44	+4,32	5,04	+3,52	2,34	+2,34	5,90	+3,29	+3,29	+3,29
3.	2,4-Д (ета-лон 2)	1,56	-2,28	1,23	-1,89	1,02	-0,5	0	0	0	-2,61	-2,61	-2,61
4.	ДПР-777	9,51	+5,67	6,79	+3,67	8,79	+7,27	1,12	+1,12	6,64	+4,03	+4,03	+4,03
5.	ДП-777	7,84	+4	5,32	+2,2	4,23	+2,71	1,56	+1,56	7,81	+5,2	+5,2	+5,2
6.	Д-777В115	13,46	+9,62	5,69	+2,57	7,79	+6,27	3,45	+3,45	11,27	+8,6	+8,6	+8,6
7.	Д-777К1	17,82	+13,98	7,84	+4,72	7,88	+6,36	4,01	+4,01	10,04	+7,43	+7,43	+7,43
	НІР0,05	1,67	-	1,25	-	1,38	-	1,05	-	1,53	-	-	-

*Примітка. – Кількість висаджених пиляків кожного генотипу в одному варіанті досліду – 300 шт.

2. – Модифікація складу живильного середовища В5 за вмістом випробуваних біологічно-активних речовин

№ п/п	Концентрації випробуваних речовин	Композиції випробуваних біологічно-активних речовин				
		контр.	вар. 1	вар. 2	вар. 3	вар. 4
1.	0,2 мг/л кінетину	+	+	+	-	-
2.	0,2 мг/л 2,4-Д	+	-	+	+	+
3.	3,0 мг/л ДГ-475	-	+	+	-	-
4.	3,0 мг/л ДПР-827775	-	-	-	+	-
5.	3,0 мг/л Д-46103	-	-	-	-	+

На модифіковані живильні середовища висаджували пиляки від рослин огірка, що належали 8 різним генотипам. Як засвідчили результати біотестів на індукцію новоутворень в пиляках суттєвий вплив мав вид регулятора росту. Розбіжність щодо частоти формування калюсу андрогенного походження у досліджених генотипів огірка в середньому становила 0,51-2,30 % (табл. 3.). Позитивно впливав на процес індукції препарат ДГ-475, особливо при композиційному застосуванні з 2,4-Д та кінетином (вар. 3, табл. 3). На пиляках усіх генотипів, що культивувалися на живильному середовищі з цією композицією регуляторів спостерігався найвищий рівень новоутворень з частотою 0,73-2,30 %. Високі показники утворення андрогенного калюсу на поверхні тканин пиляків спостерігалися також у варіанті, де 2,4-Д було замінено на ДГ-475 (вар. 2, табл. 3.). За таких умов варіація показника “частота формування калюсних клонів” у різних генотипів становила 0,66-1,25 %. На противагу у контрольному варіанту досліджу варіація була меншою і становила 0,51-0,98 %. Загалом, кращими відносно контролю виявилися композиції регуляторів росту: 0,2 мг/л кінетину + 3 мг/л ДГ-475 та 0,2 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л кінетин + 3 мг/л ДГ-475. Інші випробувані речовини майже не впливали на індукування андрогенетичних процесів в тканинах пиляків. Показники рівня індукування при використанні цих речовин були нижчими, ніж у контрольному варіанті в середньому на 20,2-33,3 %. Так, для генотипу К-609 у варіантах 4 і 5 (табл. 3), де використовувалися препарати Д-46103 і ДПР-827775 ініціації калюсних новоутворень не спостерігалось. Максимальний рівень новоутворень в пиляках – 2,3 % мав генотип к-53658, мінімальний – 0,25% сорт Джерело.

3. – Вплив біологічно-активних речовин на частоту формування зон росту калосу на поверхні
 пияків селекційно-цінних форм огірка в культурі *in vitro*, % (2008-2009 рр.)

№ п/п	Модифікація складу середовища В5 (фактор А)	Селекційно-цінні форми (фактор В)										Середнє (фактор А)
		К-49126	К-48413	К-49079	К-53515	К-53658	К-50066	К-50296	К-607			
1.	0,2 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л кінетину (контроль)	0,93	0,78	0,86	0,81	0,98	0,73	0,63	0,51	0,84		
2.	0,2 мг/л кінетину + 3 мг/л ДГ-475	1,12	0,98	1,25	1,17	1,25	0,98	1,12	0,66	1,07		
3.	0,2 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л кінетин + 3 мг/л ДГ-475	1,67	1,25	1,54	2,14	2,30	1,97	2,00	0,73	1,70		
4.	0,2 мг/л 2,4-Д + 3 мг/л ДІР-827775	0,73	0,66	0,51	0,68	0,73	0,66	0,51	0	0,56		
5.	0,2 мг/л 2,4-Д + 3 мг/л Д-46103	0,86	0,73	0,66	0,75	0,97	0,73	0,66	0	0,67		
Середнє (фактор В)		1,06	0,88	1,06	1,11	1,25	1,01	0,98	0,25			
НІР _{0,05} % (фактор А) = 0,05; НІР _{0,05} % (фактор В) = 0,07.												

Таким чином, за результатами проведеного дослідження можна зробити висновок про доцільність використання препарату ДГ-475 (3 мг/л) у складі індукційного середовища Келлера, який у композиції з відомим дедиференціатором 2,4-Д краще ініціює мітотичний поділ клітин і тим самим активізує ріст калюсу.

Висновки. Виявлено високі властивості щодо ініціації росту калюсу в культурі пиляків огірка регулятора ауксинової дії, похідного піридину – ДГ-475, використання якого у концентрації 3 мг/л у композиції з 0,2 мг/л 2,4-Д та 0,2 мг/л кінетину у складі індукційного модифікованого середовища В5 призводить до посилення росту калюсу у 2-3 рази. Встановлено суттєвий вплив на індукцію росту проембріонального калюсу в культурі пиляків огірка *in vitro* попередньої обробки донорних рослин регуляторами росту – НОК та регуляторів, похідних піридину – ДПР-777, Д-77КИ, Д-777В115. Така попередня обробка дозволяє посилити ріст андрогенетичних новоутворень в пиляках огірка *in vitro* у 0,71-4,18 рази.

Бібліографія.

1. Потрійний гібрид огірка Єврика: Заявка на патент № 08035002 від 01.02.2008.- 5с. Лісіцин В.Н., Лісіцина Р.П., Плужнікова Л.Є.(20%-46), Сергієнко О.В. (5%-16), Солодовнік Л.Д. (10%-26), Харченко Н.М. (5%-16), Цветков А. С. (5%-16).
2. Петрова Л.Н. Влияние регуляторов роста на развитие и продуктивность растений. – Москва, СНИИСХ, 1988г. – С. 104-110.
3. Сергієнко О.В., Лісіцин В.М., Дульнев П.Г. Використання нових росторегулюючих препаратів для підвищення урожайності насіння огірків // Овочівництво і баштанництво. – 2003. – Вип. 48. – С.260-264.
4. Тырнов В.С. Гаплоидия у растений: научное и прикладное значение // М. : Наука. – 1998. – 53 с.
5. Седова Н.Ю. Разработка лабораторной технологии получения андрогенных растений белокочанной капусты с использованием культуры пыльников: Автореф. дис. ... канд. б. наук:

03.00.23 / ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур РАН. – М., 1992. – 17 с.

6. Poliakov A.V., Ilchenko O.V. Production of andro- and gynogenic plants of carrot (*Daucus carota* L.) // Сб. научных трудов междунар. научно-практич. конф. «Биотехнология овощных, цветочных и малораспространенных культур». – Москва, 22-25 марта 2004. – М., 2004. – С.146-150

7. Білінська О.В. Застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції голозерного ячменю // Селекція і насінництво. – 2002. – Вип.86. – С.164-172.

8. Маруненко И.М. Условия, способствующие развитию микроспор по спорофитному пути и получение гаплоидов в культуре пыльников картофеля: Автореф. дис. ... канд. б. наук: 03.00.12 / Институт картофелеводства УААН. – Немешаево, 1986. – 24 с.

9. Круглова Н.Н. и др. Морфогенез в культуре изолированных пыльников: роль фитогормонов // Успехи соврем.биол. – 1999. – Т.119. – Вып.6. – С.567-577.

10. Ніколаєвська А.О., Іващенко Я.М., Карабанов Ю.В. Застосування нового стимулятора – препарату №31 при вирощуванні помідорів і огірків // Овочівництво і баштанництво. – 1973. – Вип. 16. – С.16-25.

11. Пономаренко С.П., Николаенко Т.К., Троян В.М., Яворская В.К., Паладина Т.А., Боровиков Ю.Я. Регуляторы роста на основе п-окисов производных пиридина. Физико-химические свойства и механизм действия // Регуляторы роста растений. – К. : РДЭНТП, 1992. – С.28-52.

С.И. Кондратенко, О.В. Сергиенко, Л.А. Радченко, Л.Д. Солодовник, П.Г. Дульнев

Действие регуляторов роста, производных пиридина на формирование андрогенных новообразований в культуре пыльников огурца *in vitro*.

Резюме. Проведены испытания биологически активных соединений, производных пиридина в культуре пыльников огурца *in vitro*. Доказано, что введение регулятора ДГ-475 в

композиции с 2,4-Д и кинетином в состав питательной среды В5 приводит к усилению роста каллуса андрогенного происхождения. Установлено существенное влияние на рост проэмбрионального каллуса предварительной обработки донорных растений огурца водными растворами регуляторов роста – НУК, ДПР-777, Д-77КИ и Д-777В115.

S.I. Kondratenko, O. V. Sergienko, L. A. Radchenko, L.D. Solodovnik P.G. Dul'nev

The action of growth regulators, derivatives from pyridine on the formation of androgenic callus in anther of cucumber crop in vitro.

Summary. Tests of biologically active compounds, pyridine derivatives, in anther culture of cucumber in vitro were conducted. It was proved that the using of the growth regulator DG-475 in addition with 2,4-D and kinetin in the nutrient medium B5 leads to increased the growth of androgenic calluses. It was found the significant effect on the growth of androgenic calluses the pretreatment of cucumber plants by aqueous solutions such growth regulators as NAA, the DPR-777, D-77KI and D-777V115.