

Національна Академія наук України  
Інститут клітинної біології та генної інженерії

На правах рукопису

УДК 543.545:577.152.193: 633.361:576.536

Задерей Наталія Сергіївна

Культивування тканин і індукція морфогенезу  
in vitro у еспарцету (*Onobrychis sp.*)

03.00.25 - клітинна біологія

АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ 1997



00742838 (W)

Роботу виконано в лабораторії біології та генетики Одеського селекційно-генетичного інституту кафедри генетики і молекулярної біології Одеського державного університету ім. І.І. Мечнікова

Наукові керівники - доктор біологічних наук, професор  
В.М. Тоцький,  
кандидат біологічних наук  
С.О. Ігнатова

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук, професор  
В.А. Кунах,  
кандидат біологічних наук  
М.В. Кучук

Провідна організація - Інститут агроекології і біотехнології  
УААН

Захист відбудеться "30" вересня 1997 р. о 14 год.  
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.19.01 при Інституті  
клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адре-  
сою: 252143, Київ, вул. Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту  
клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Автореферат розісланий "14" серпня 1997 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради,  
кандидат біологічних наук

Л.В. Тарасенко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** Забезпечити тваринництво кормами в засушливих умовах півдня України можна шляхом створення засухостійких сортів кормових рослин. Перспективною кормовою культурою для півдня України є еспарцет. Незважаючи на жорсткість кормів, харчова цінність еспарцету досить велика. Він засухо- і морозостійкий; менше піддається ураженню вірусними інфекціями, які широко розповсюджені в цьому регіоні, запобігає розвитку тимпанії у тварин (Оруджаєв А.К., Мамедов А.І., 1966; Ганнібал О.В., 1983; Балаболін М.А., 1984). Селекція еспарцету інтенсивно ведеться у відділі селекції і насінництва Одеського селекційно-генетичного інституту. Підвищити ефективність селекції можна шляхом створення вихідного селекційного матеріалу з заданими властивостями за допомогою культури *in vitro*. В Україні дослідження щодо розробки технології культивування еспарцету *in vitro* не проводились. Поодинокі публікації, які є в зарубіжній літературі (Ahuja P.S. et al., 1983; Zhuping G.U., 1987; Jia Jing-fen, 1989; Tie-gang et al., 1990) свідчать про відсутність оптимальних технологій отримання регенерантів при культивуванні тканин, клітин і протопластів еспарцету. Зовсім не досліджені особливості диференціації клітин та морфогенезу за культивування калусних культур еспарцету, не з'ясовані шляхи оптимізації цих процесів, а, отже, способи спрямованого стимулювання регенерації рослин. До того ж слід зазначити, що існуючі поодинокі дослідження по культивуванню тканин та клітин еспарцету *in vitro* проведені на сортах лише одного виду рослини - Е. Звичайного.

Саме тому перед лабораторією біотехнології Одеського селекційно-генетичного інституту поставлено завдання розробити ефективну технологію культивування еспарцету *in vitro* з метою отримання вихідного селекційного матеріалу. Все вищезазначене і обумовило мету дисертаційної роботи.

**Мета та завдання досліджень.** Головна мета досліджень полягала в розробці технології культивування тканин і клітин еспарцету і вивченні клітинного диференціювання і морфогенезу *in vitro*.

До конкретних завдань роботи входило:

1. Оптимізувати умови отримання калусних культур і індукції регенераційних процесів у перспективних з точки зору подальшої селекційної роботи форм еспарцету.
2. Розробити методику виділення життєздатних протопластів еспарцету;
3. Вивчити залежність диференціювання і морфогенезу в культурі тканин і клітин еспарцету від співвідношення фітогормонів в поживних середовищах;
4. Дослідити експресивність ген-ензимної системи пероксидази (вивчити активність і множинні молекулярні форми (ММФ) ферменту) в процесі де- і диференціації клітин еспарцету *in vitro* з метою маркування окремих етапів цих процесів, розробки способів їх прогнозу, а також критеріїв ефективності їх регулювання шляхом модифікації хімічного складу поживних середовищ.

**Наукова новизна результатів досліджень.** Запропонована високоефективна технологія культивування тканин і клітин та регенерації рослин для ряду видів роду *Onobrychis*, різних за своїм морфогенетичним потенціалом. Отримана за цією технологією культура запропонована за модель для вивчення процесів диференціювання і морфогенезу у еспарцету. За допомогою цієї моделі отримані нові дані щодо можливості корекції диференціювання і морфогенезу гормонами і іншими компонентами середовища.

Вперше вивчені видові особливості експресії ген-ензимної системи пероксидази у еспарцету. Встановлено, що окремі молекулярні форми цього ферменту є специфічними для певних стадій диференціювання клітин і морфогенезу, а тому можуть використовуватись як критерій рівня диференціювання (пероксидазний тест).

**Практична цінність роботи.** Розроблена нами система регенерації рослин з листових, сім'ядольних, гіпокотилевих і корневих експлантів для сортів еспарцету, отриманих у відділі селекції і насінництва бобових культур Одеського селекційно-генетичного інституту дає можливість отримати вихідний матеріал для селекції і скоротити строки селекційного процесу. Запропонована технологія культивування і регенерації цілих рослин може бути використана для клонування цінних генотипів, отримання соматоклональних варіантів і мутантних форм, а також дощухування гібридних зародків.

#### **Положення, що виносяться на захист.**

1. Запроновані умови культивування тканин *in vitro* дають можливість з високою частотою регенерувати рослини з листових, сім'ядольних, гіпокотилевих експлантів еспарцету.
2. Гістологічний і цитологічний аналіз отриманих калусних культур дозволяє виявити залежність типу морфогенезу у еспарцету від співвідношення гормоноактивних речовин в поживному середовищі.
3. Морфогенетичний потенціал тканин еспарцету в культурі *in vitro* визначається їх видовою і сортовою належністю.
4. Активність і поліморфізм пероксидази можна використовувати як маркер окремих етапів морфогенезу в культурі *in vitro* еспарцету.
5. Розроблена методика виділення протопластів з мезофілу листа еспарцету дає можливість з високою ефективністю отримувати життєздатні ізольовані клітини.

**Апробація роботи.** Основні положення та результати дисертації представлялись на науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів (Чабани, 1991), на Всесоюзній конференції "Досягнення біотехнології агропромислового комплексу" (Чернівці, 1991), на VI Українському з'їзді генетиків і селекціонерів (Полтава, 1992), на міжнародному симпозиумі по

генетичній інженерії і біотехнології рослин (Київ, 1994), на науковій конференції Одеського державного університету (Одеса, 1996), на науковому семінарі відділу цитофізіології і клітинної інженерії Інституту клітинної біології і генетичної інженерії (Київ, 1997).

**Об'єм і структура роботи.** Дисертація викладена на 156 сторінках машинописного тексту, складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, заключення, висновків та списку використаної літератури. Робота вміщує 33 таблиці і 49 малюнків. Бібліографічний список включає 217 літературних джерел, із них 95 на іноземних мовах.

#### **Матеріали і методика досліджень**

В роботі використані сорти трьох видів еспарцету і один міжвидовий гібрид:

- Е. звичайний (*O. viciifolia* Scop.) - сорти Мустанг і Агат;
- Е. пісчаний (*O. arenaria* D.C.) - сорт Альтаір і генотип 3010,
- Е. неозброєний (*O. inornis* Stev.) - генотип В-5 3070,
- міжвидовий гібрид [Пісчаний 1251×Закавказький 9696] - сорт Південноукраїнський.

Проліферативну активність експлантів і регенераційну здатність тканин еспарцету вивчали в культурі *in vitro*. Експлантами були гіпокотилі, корені, листки і сім'ядолі 6-10-денних і 28-30-денних проростків еспарцету. Для індукції калусогенезу і наступного субкультивування калусів використовували середовища ШХ (Schenk, Hildebrandt, 1972), МС (Murashige, Skoog, 1962), ЛС (Linsmeyer, Skoog, 1965). Середовища доповнювали гормонами (2,4 -Д, ІМК, БАП, тригонелін) в різних концентраціях і співвідношеннях. Для індукції регенерації використовували середовища з зеатин-рибозидом та 2-ізопентиламінопурином (2iП). Ризогенез стимулювали індолил-3-оцтовою (ІОК) та 1-нафтілоцтовою (НОК) кислотами.

Морфологію калусних тканин вивчали за допомогою комп'ютеризованої системи обробки оптичного зображення MOP-VIDEOPLAN фірми "Opton" (ФРН). Цитологічний аналіз калусів здійснювали в приготовлених суспензіях і на постійних препаратах.

Пероксидазну активність в калусних тканинах визначали спектрофотометрично (Бояркін А.Н., 1951). ММФ пероксидази визначали за допомогою електрофорезу в поліакріламідному гелі в апараті для вертикального електрофорезу LKP 2001 Vertical Elektrophoresis (Davis, 1964). Гістохімічну ідентифікацію пероксидаз на електрофореграмах здійснювали за методом Liu (1973).

Амінокислотний склад калусної маси, тканин та насіння еспарцету визначали на амінокислотному аналізаторі (Stein, Moore, 1961).

## Результати досліджень та їх обговорення

### 1. Оптимізація умов виділення протопластів з мезофілу листа еспарцету

Розроблена технологія отримання протопластів листа еспарцету. Найбільш придатними для виділення протопластів виявились молоді рослини в віці 20-30 днів, листові пластинки яких повинні бути не старші 6-8 днів. Максимальний вихід протопластів отримано в результаті інкубації листків еспарцету зі знятим епідермісом в ферментному розчині, що містив  $27 \times 10^{-5}$  М целюлази і  $3 \times 10^{-5}$  М пектинази, а також осмопротектори - 0,5 М маніт, 0,27 М хлористий кальцій, 0,1 М гліцин. Оптимальними умовами були температура інкубації 25 °С та утримання рослин в темноті перед виділенням протопластів.

Виявлено сортові відмінності виходу протопластів (табл. 1). Так, з мезофілу листа рослин сорту Мустанг вдається отримати в два рази більше протопластів, ніж з мезофілу листа генотипу В-5 3070.

Таблиця 1. Вихід протопластів з мезофілу листа еспарцету в залежності від генотипу рослини

Показники	сорт Мустанг	генотип В-5 3070
Число протопластів в 1 мл суспензії $\times 10^5$	13,93 $\pm$ 3,48	6,48 $\pm$ 1,41 p<0,001
Вихід в %	100	46,5

Примітка: вік рослини - 20-23 дні, другий лист - у віці 6-9 днів; концентрація ферментів: целюлаза -  $27 \times 10^{-5}$  М, пектиназа -  $3 \times 10^{-5}$  М; концентрація маніту - 0,5 М; листки без епідермісу.

Слід відмітити, що запропонована нами технологія дозволяє досягти значно більшого виходу протопластів з мезофілу листа еспарцету ( $14,6 \times 10^6$  протопластів в розрахунку на один грам тканини), порівняно з даними англійських вчених (Ahuja et al., 1983), у яких вихід протопластів після попереднього плазмолізу тканин складав  $8,5 \times 10^6$ .

## 2. Визначення оптимального сольового, вітамінного і гормонального складу поживних середовищ, необхідних для проліферації клітин еспарцету *in vitro*

З метою оптимізації умов культивування *in vitro* тканин, клітин і протопластів еспарцету збалансовано співвідношення солевих, вітамінних і гормональних компонентів поживних середовищ для різних об'єктів культивування (листя, сім'ядолі, гіпокотилі, корені, зрілі ізольовані зародки). Запропоновані зарубіжними авторами середовища свідчать про відсутність єдиної думки відносно умов індукції калусоутворення у еспарцету. Зокрема L. Heszky (1975), S. Arcioni і D. Mariotti (1982), F. Puppili та ін. (1989) вважають достатнім використання 2,4-Д для індукції калусогенезу у еспарцету. В той же час G. Zhuping (1987) стверджує, що ауксини непотрібні для культивування тканин еспар-

цету. Для індукції калусогенезу і наступної регенерації через соматичний ембріоїдогенез він вважає за необхідне використання цитокініну БА. Відсутність в зазначених роботах цитологічного контролю за процесами морфогенезу *in vitro* не дає можливості з'ясувати особливості впливу кожної з використаних фізіологічно активних речовин.

Все це спонукало нас до комплексних морфологічних, цитологічних і генетико-біохімічних досліджень з метою вивчення морфогенетичних процесів в тканинах і клітинах еспарцету, які культивували на середовищах з різним сольовим, гормональним та вітамінним складом. З'ясувалось, що середовище Гамборга В<sub>9</sub> не придатне для культивування еспарцету. На середовищі N<sub>0</sub> зародки еспарцету розвиваються більш активно, однак недорозвинення листових пластинок свідчить про недостатнє живлення рослин. Середовища ШХ і МС забезпечують необхідний баланс сольових та вітамінних компонентів і стимулюють розвиток нормальних рослин, в зв'язку з чим вони були запропоновані для культивування тканин і клітин еспарцету.

Нами вивчено вплив таких фізіологічно активних речовин, як 2,4-Д, ІМК, БАП і тригонелін на проліферацію клітин еспарцету. Ефективність гормонального складу середовища визначали за швидкістю індукції калусогенезу, числом експлантів, що утворюють калус, масою калусу. Встановлено, що різні гормоноактивні речовини неоднаково впливають на хід морфогенезу в культурі еспарцету *in vitro*. Так, 2,4-Д прискорює дедиференціацію клітин еспарцету, що супроводжується значним набуханням тканин і неорганізованим ростом клітин, які виявляються вже на третій день культивування експлантів на поживному середовищі. БАП також стимулює неорганізований ріст тканин, але швидкість цього процесу значно нижча, ніж за наявності 2,4-Д. На середовищі без гормонів, а також за окремих добавок тригонеліну і ІМК калус практично не утворюється, за винятком невеликих островків, виникнення яких може бути обумовлене травматичною індукцією під час ізоляції експланту. На середовищі

з 2,4-Д відбувається не тільки більш швидка індукція калусоутворення, але і значно більший вихід калусу в першому пасажі. Маса калусу, отриманого на середовищі з 2,4-Д, в два рази перевищує масу калусу на середовищі з БАП (табл. 2).

Таблиця 2. Вплив фізіологічно активних речовин на ріст калусу сорту Мустанг

Маса експланту, мг	Маса калусу, сформованого на різних середовищах, мг				
	Без гормонів	ІМК, 1 мг/л	БАП, 1 мг/л	2,4-Д, 1 мг/л	Тригонелін 5 мг/л
25,6±4,6	86,1±18,9	122,4±38,2	242,5±82,6	462,3±22,5	74,0±17,3

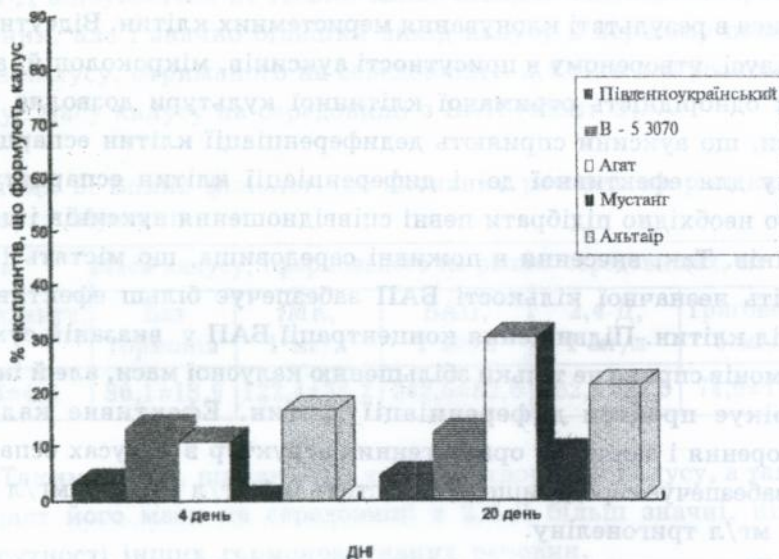
Таким чином, швидкість і частота утворення калусу, а також приріст його маси на середовищі з 2,4-Д більш значні, ніж в присутності інших гормоноактивних речовин.

Нами виявлено значні відмінності в морфології тканин, що зросли на поживних середовищах з різними гормоноактивними сполуками. Саме це, а також та обставина, що значне наростання калусної маси в присутності 2,4-Д не завжди корелює з її здатністю до регенерації, спонукали нас до цитологічного дослідження первинного калусу. За допомогою системи MOP-VIDEOPLAN встановлено, що клітини еспарцету на середовищах з ауксинами набували веретеноподібної або округло-овальної форми. На середовищі з БАП утворювалися калусні клітини двох типів. Клітини одного типу мали довгу, веретеноподібну форму і нагадували клітини, що появляються на середовищі з ауксинами. Клітини другого типу мали значно менші розміри, округлу форму і часто групувались у мікрокалуси.

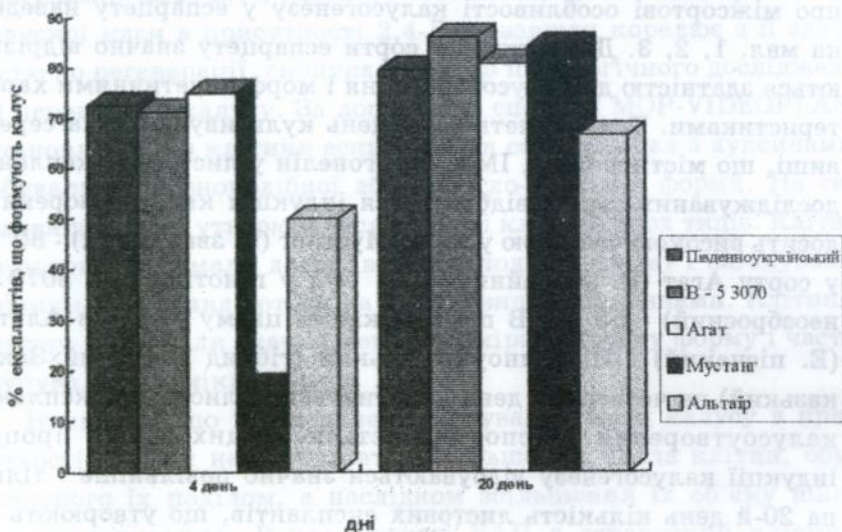
Виявлено, що інтенсивне нарощування маси калусу в присутності 2,4-Д є не результатом збільшення числа клітин, обумовленого їх поділом, а наслідком збільшення їх об'єму шляхом розтягування. В присутності БАП в середовищі клітини еспарцету зберігають свою спеціалізацію. Довгі веретеноподібні клітини можуть представляти собою паренхімні клітини, що роз-

рослися в об'ємі в умовах культури *in vitro*, а мікрокалуси утворилися в результаті клонування меристемних клітин. Відсутність в калусі, утвореному в присутності ауксинів, мікроколоній, а також однорідність отриманої клітинної культури дозволяє вважати, що ауксини сприяють дедиференціації клітин еспарцету. Тому для ефективної де- і диференціації клітин еспарцету *in vitro* необхідно підібрати певні співвідношення ауксинів і цитокинінів. Так, внесення в поживні середовища, що містять ІМК, навіть незначної кількості БАП забезпечує більш ефективний поділ клітин. Підвищення концентрації БАП у вказаній суміші гормонів сприяє не тільки збільшенню калусної маси, але й інтенсифікує процеси диференціації клітин. Ефективне калусоутворення і закладку органогенних структур в калусах еспарцету забезпечує середовище, яке містить 0,4 мг/л БАП, 2 мг/л ІМК і 5 мг/л тригонеліну.

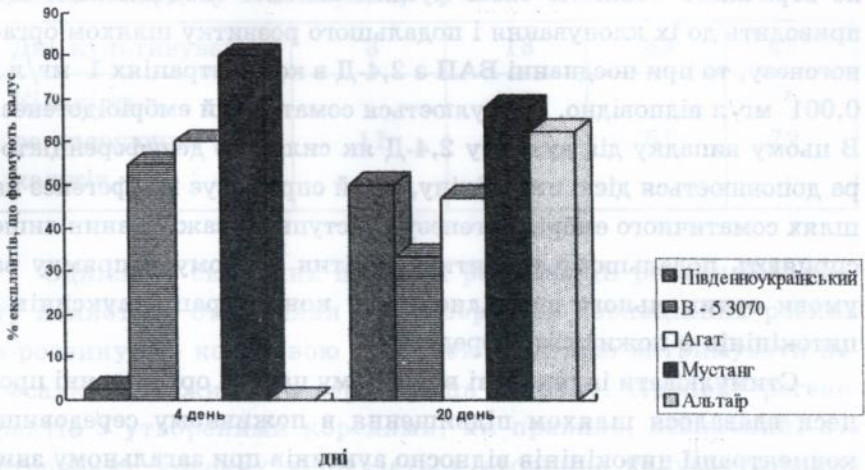
Відомо, що процеси калусоутворення залежать від генотипу рослин. Однак для еспарцету особливості морфогенетичного потенціалу різних його сортів не з'ясовані. Отримані нами дані про міжсортіві особливості калусогенезу у еспарцету наведено на мал. 1, 2, 3. Досліджувані сорти еспарцету значно відрізняються здатністю до калусоутворення і морфогенетичними характеристиками. Так, на четвертий день культивування на середовищі, що містить БАП, ІМК і тригонелін у листових експлантів досліджуваних сортів відбувається індукція калусоутворення з досить високою частотою у сорту Мустанг (Е. звичайний) - 80 %, у сорту Агат (Е. звичайний) - 60 % і у генотипу В-5 3070 (Е. неозброєний) - 55 %. В протилежність цьому у сортів Альтаїр (Е. пісчаний) і Південноукраїнський (гібрид Пісчаний×Закавказький) на четвертий день культивування листових експлантів калусоутворення не спостерігається. У цих сортів процеси індукції калусогенезу відбуваються значно повільніше і тільки на 20-й день кількість листових експлантів, що утворюють калус, досягає 67 % у Альтаїру і 50 % у Південноукраїнського.



Мал. 1 Міжсортові особливості інтенсивності калусоутворення у експлантів з коренів еспарцету



Мал. 2. Міжсортові особливості інтенсивності калусоутворення у експлантів з гіпокотилів еспарцету



Мал. 3. Міжсорткові особливості інтенсивності калусоутворення у експлантів з листків еспарцету

Ефективність калусоутворення і наступної регенерації рослин залежить не тільки від генотипу рослин, але й від конкретного органу рослини. Нами встановлена низька калусоутворювальна здатність корневих експлантів всіх п'яти досліджуваних сортів еспарцету. У сортів Агат, В-5 3070 і Південноукраїнський максимальною калусоутворювальною здатністю відзначаються експланти гіпокотилів, а у сорту Мустанг - експланти листків.

### 3. Розробка технології культивування тканин і клітин еспарцету, отримання рослин регенерантів

Уже в первинному калусі еспарцету спостерігаються структурні відмінності між калусними тканинами в залежності від напрямку їх регенерації по типу органогенезу чи соматичного ембріодогенезу.

Якщо на поживному середовищі без 2,4-Д клітини еспарцету не втрачають повністю своєї функціональної спеціалізації, що приводить до їх клонування і подальшого розвитку шляхом органогенезу, то при поєднанні БАП з 2,4-Д в концентраціях 1 мг/л і 0,001 мг/л відповідно, стимулюється соматичний ембріодогенез. В цьому випадку дія ауксину 2,4-Д як сильного дедиференціатора доповнюється дією цитокініну, який спрямовує морфогенез на шлях соматичного ембріодогенезу. Наступні пасажі тканин лише сприяють подальшому розвитку клітин в цьому напрямку за умови оптимального співвідношення концентрацій ауксинів і цитокінінів в поживному середовищі.

Стимулювати індуковані в першому пасажі органогенні процеси вдавалося шляхом підвищення в поживному середовищі концентрації цитокінінів відносно ауксинів при загальному зниженні рівня гормонів в 10 разів. Калус, що субкультивувався на поживному середовищі МС, яке містило 0,2 мг/л ІМК, 0,05 мг/л БАП, 0,5 мг/л зеатин-рибозиду і 200 мг/л пептон-гідролізату, вже на третій-п'ятий день культивування на світлі утворював щільні глобулярні структури зеленого кольору.

З метою прискорення морфогенетичних процесів калусну тканину в третьому пасажі поміщали в рідке середовище МС із зменшеним наполовину вмістом солей і вітамінів, але з попереднім вмістом гормонів. Уже на шостий день культивування калусу в рідкому середовищі при обертанні на круговій гойдалці зі швидкістю 60 об/хв утворювалися щільні глобулярні структури та ембріоїди довжиною від 3 до 7 мм. Мікроскопічний аналіз поздовжнього зрізу ембріоїдів свідчить про наявність точок росту пагона і кореня, тобто про біполярність структури.

Для стимуляції регенерації пагонів часто використовується цитокінін 2iП (Lehminger M.B., Jakobsen H.I., 1989; F. Pupilli et al., 1989). В результаті пересадки отриманих нами калусів на середовище з 2iП відбувався розвиток пагонів-регенерантів з утворених в калусній культурі адвентивних бруньок (табл.3).

Таблиця 3. Динаміка утворення регенерантів з калусної тканини еспарцету в четвертому пасажі

Дні культивування	3	13	33	43
Кількість регенеруючих калусів, %	11	50	61	72

Однією із складних проблем регенерації рослин еспарцету являється отримання з регенерантів повноцінних рослин з розвинутою кореневою системою, здатною витримувати пересадку з поживного середовища в ґрунт. Процент регенерантів з утвореними коренями, як правило, незначний, а в утворених коренях відбувається вторинне калусоутворення (Arcioni S., Mariotti D., 1982; Pupilli F., 1989). Підібравши оптимальні умови живлення, освітлення і температури, ми пропонуємо ефективну систему ризогенезу у регенерантів еспарцету. Для стимуляції коренеутворення необхідно культивувати пагони в середовищі ШХ, яке містить половинну від норми кількість солей і вітамінів при повній відсутності чи мінімальній кількості в ньому сахарози і за наявності, залежно від сорту, різних концентрацій ІОК (в межах 0,02-1,0 мг/л). Крім цього, першорядне значення для коренеутворення еспарцету мають інтенсивність освітлення і температура. Так, в кліматичній камері з освітленістю 25-30 тис. лк. і при температурі 20-25 °С регенеранти гинули на протязі тижня. Регенеранти, які утримувалися в культуральній кімнаті з освітленістю 2-3 тис. лк., мали вітрифіковане листя, утворювали поодинокі корені, які формували вторинний калус. Пагони-регенеранти, утримувані в розсіяному світлі при температурі 18-20 °С, формували корені.

#### 4. Ген-ензимна система пероксидази і морфогенез в культурі тканин різних генотипів еспарцету

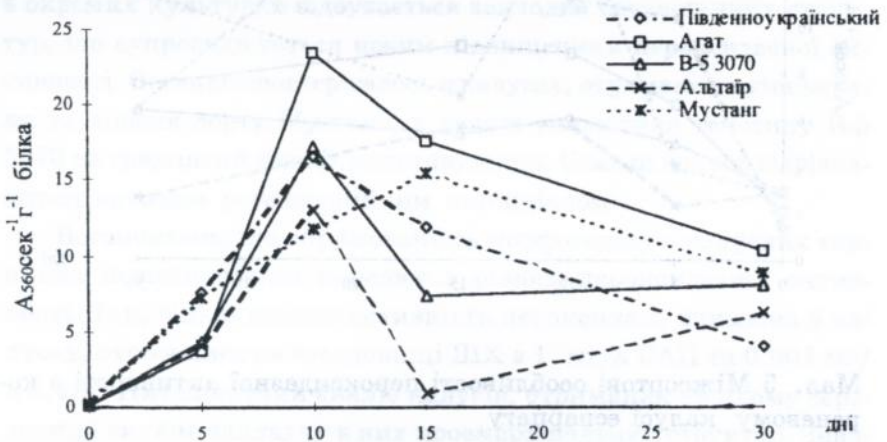
Своєчасну направлену регуляцію морфогенетичних процесів в культурі *in vitro* шляхом корекції хімічного складу поживних середовищ можна здійснювати за умови наявності чутливої тестової системи, яка б дозволяла ідентифікувати навіть незначні зміни морфогенезу ще до того, як вони проявляються візуально. Оскільки утворення калусу, чи закладка органогенних структур в калусі обумовлені змінами еспресії окремих генів геному, то маркерами цих процесів можуть бути ген-ензимні системи (Конарев В.Г., 1985а, 1985б). Багато авторів пропонують використовувати ген-ензимну систему пероксидази як тест для контролю за морфогенезом у рослин (Андреева В.А., 1988; Rao K.V. et al., 1990; Забродина М.В. і ін., 1996). На жаль, число досліджених в цьому відношенні видів невелике, а тому залишається неясним, наскільки універсальною є ген-ензимна система пероксидази в ролі критерію рівня диференціації клітин і морфогенезу.

Ми вивчали активність і множинні молекулярні форми пероксидази одночасно з цитологічним аналізом структури культивованих *in vitro* тканин з метою з'ясування можливості використання пероксидазного тесту для маркування окремих стадій калусоутворення і морфогенезу за культивування експлантів еспарцету, а саме: 1. індукція калусоутворення; 2. стадія сформованого калусу; 3. індукція диференціації в загальній масі недиференційованих клітин; 4. стадія старіння калусу.

Виявлено, що ген-ензимна система пероксидази характеризується певними особливостями експресії в різні строки культивування тканин еспарцету *in vitro*, причому ці особливості в значній мірі визначаються органомою і видовою належністю експланту.

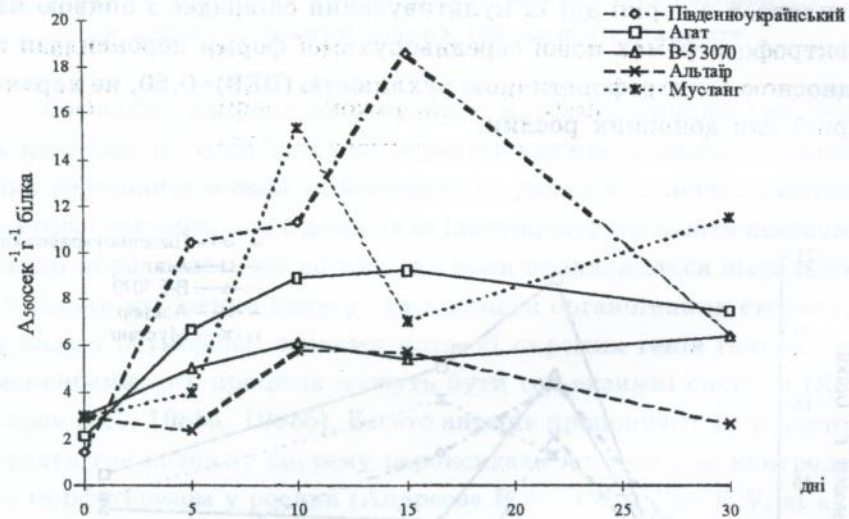
Встановлено значне підвищення пероксидазної активності в експлантах всіх досліджуваних генотипів еспарцету на протязі перших п'яти діб їх культивування (мал. 4, 5, 6) в порівнянні з вихідними рослинами. Підвищення пероксидазної активності в

експлантах в перші дні їх культивування співпадає з появою на електрофореграмах нової середньорухомої форми пероксидази з відносною електрофоретичною рухливістю (ВЕР)=0,50, не характерної для донорних рослин.

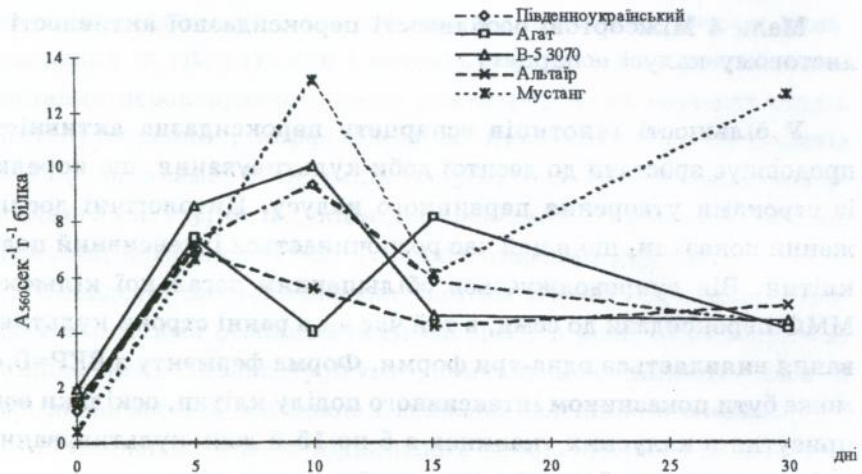


Мал. 4 Міжсорткові особливості пероксидазної активності в листовому калусі еспарцету

У більшості генотипів еспарцету пероксидазна активність продовжує зростати до десятої доби культивування, що корелює із строками утворення первинного калусу. Цитологічні дослідження показали, що в цей час розпочинається інтенсивний поділ клітин. Він супроводжується збільшенням загальної кількості ММФ пероксидази до семи, в той час як в ранні строки культивування виявляється одна-три форми. Форма ферменту з ВЕР=0,43 може бути показником інтенсивного поділу клітин, оскільки вона присутня в калусних тканинах з 5 по 15-й день культивування, тобто в період найвищої мітотичної активності.



Мал. 5 Міжсорткові особливості пероксидазної активності в кореновому калусі еспарцету



Мал. 6 Міжсорткові особливості пероксидазної активності в калусі з гіпокотилу еспарцету

В наступні, більш пізні строки культивування у більшості генотипів еспарцету за їх утримання без пересадки на інші поживні середовища спостерігається зниження пероксидазної активності. Ці біохімічні зміни співпадають з поступовим потемнінням і старінням калусних тканин. Однак, крім зазначеної тенденції до загального зниження проліферативної активності клітин калусу, в окремих культурах відбувається закладка органогенних структур, що супроводжується новим підвищенням пероксидазної активності. Останнє спостерігалось в калусах, отриманих з гіпокотилу та кореня сорту Мустанг, а також гіпокотилу генотипу В-5 3070 на тридцятий день їх культивування. Саме ці калуси відрізняються високим регенераційним потенціалом.

Встановлено, що спрямованість морфогенезу в калусних тканинах певним чином корелює з рівнем пероксидазної активності. Так, більш висока активність пероксидази виявлена в калусах, отриманих на середовищі ШХ з 1 мг/л БАП та 0,001 мг/л 2,4-Д. Цитологічний аналіз калусів, отриманих на цьому середовищі виявив закладку в них проембріональних структур. Значно нижчу пероксидазну активність мають ті калуси, в загальній масі яких розпочинається пагоневий органогенез. Ця закономірність дає змогу запропонувати використання показника пероксидазної активності для оцінки морфогенетичного потенціалу калусних тканин, які передбачається використовувати для виділення протопластів. Виходячи з отриманих результатів, можна припустити, що використання листових пластинок рослин еспарцету для отримання протопластів не дозволить отримати клітини, здатні до поділу, утворення мікроколоній і регенерантів. Саме на це вказує низька активність пероксидази в листках донорних рослин еспарцету. В той же час первиний калус відрізняється високою пероксидазною активністю, що може свідчити про прискорення певних метаболічних процесів в його клітинах, зв'язане з утратою клітинної спеціалізації. Використання таких клітин для отримання протопластів еспарцету може сприяти більш високій життєздатності останніх.

Слід підкреслити, що тканини, які культивуються на поживному середовищі з 2,4-Д, мають значно вищу пероксидазну активність, ніж на середовищах з іншими фізіологічно активними речовинами, але повністю втрачають свою спеціалізацію. Тривала інкубація тканин еспарцету на поживному середовищі з 2,4-Д стимулює розтягування клітин, після чого вони втрачають здатність до регенерації. Тому найбільш перспективним підходом в роботі з протопластами еспарцету є виділення їх з первинного калусу, утвореного за наявності 2,4-Д, з наступним їх культивуванням на поживних середовищах, що містять цитокініни БАП і зеатинрибозид, які стимулюють органогенні процеси.

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено технологію культивування тканин та клітин еспарцету і вивчено особливості морфогенезу і регенерації рослин *in vitro* у різних форм еспарцету вітчизняної селекції.
2. Процеси калусоутворення, морфогенезу і регенерації у досліджуваних рослин визначаються видовою і сортовою належністю.
3. Активність і спектри множинних молекулярних форм пероксидази являються показниками ступеню диференційованості клітин в культурі, спрямованості морфогенезу і морфогенетичного потенціалу окремих сортів еспарцету.
4. Розроблено умови ефективного виділення протопластів з мезофілу листків еспарцету. Показано міжсортові особливості кількісного виходу протопластів.
5. Запропонована технологія регенерації рослин еспарцету може використовуватись для клонування цінних генотипів цієї культури.

## Список робіт, опублікованих по темі дисертації

1. Игнатова С.А., Задерей Н.С. Условия выделения протопластов из мезофилла листа эспарцета // Научно-технический бюллетень Всесоюзного селекционно-генетического института. - 1990. - № 1(75).- С.52-55.

2. Задерей Н.С. Формирование каллуса и регенерация растений эспарцета // Научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов. Чабаны. - 1991.- С.91.
3. Игнатова С.А., Задерей Н.С., Александрова Л.Г. Оптимизация условий регенерации растений эспарцета // Всесоюзная конференция " Достижения биотехнологии агропромышленному комплексу". Черновцы. - 1991. - С.45.
4. Игнатова С.А., Задерей Н.С. Изучение условий выделения протопластов из мезофилла листа эспарцета // Материалы VI съезда УоГиС. Полтава. - 1992. - С.117-118.
5. Задерей Н.С., Игнатова С.А. Особенности пролиферации и регенерации тканей эспарцета// Методы биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений / Под ред. С.В. Бирюкова. - Одесса: СГИ. - 1992. - С.49-58.
6. Zadorej N.S. Morphogenetic processes in the tissue culture of sainfoin // International Symposium "Plant Biotechnology and Genetic Engineering". Kiev, the Ukraine.- 1994. - P.120.
7. Задерей Н.С., Игнатова С.А., Тоцкий В.Н. Множественные молекулярные формы пероксидазы и морфогенетические процессы у эспарцета при культивировании эксплантов // Цитология и генетика. - 1996, - т.75, № 2. - С.46-52.

**Задерей Н.С.** "Культивирование тканей и индукция морфогенеза *in vitro* у эспарцета (*Onobrychis* sp.)".

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.25-клеточная биология. Селекционно-генетический институт УААН, Одесса, 1997.

Защищается 7 научных работ по теме диссертации.

Представляется к защите диссертация, которая содержит разработанную технологию культивирования тканей и клеток некоторых видов рода *Onobrychis* sp. Предложена методика выделения жизнеспособных протопластов эспарцета. Оптимизированы условия получения каллусных культур и индукции регенерационных процессов у ряда перспективных, с точки зрения дальнейшей селекционной работы, сортов эспарцета. Использование полученной *in vitro* культуры эспарцета в качестве моде-

ли для изучения механизмов клеточной дифференцировки и морфогенеза у эспарцета позволило получить новые данные о возможности коррекции этих процессов гормонами и другими компонентами питательной среды. Изучены видовые особенности экспрессии ген-энзимной системы пероксидазы в культуре эспарцета *in vitro*. Установлено, что отдельные молекулярные формы этого фермента специфичны для определенных стадий дифференцировки клеток и морфогенеза, поэтому могут использоваться в качестве критериев уровня дифференцировки (пероксидазный тест).

**Ключевые слова:** эспарцет, протопласты, каллусные ткани, растения-регенеранты, маркеры морфогенеза, ген-энзимная система пероксидазы.

**Zaderey N.S.** "Cultivating tissues and the induction of morphogenesis *in vitro* of the sainfoin (*Onobrychis* sp.)".

Dissertation for the academic degree of candidate of biological sciences, speciality 03.00.25-cell biology. Selection-genetics institute of UAAS, Odessa, 1977.

7 scientific works on the dissertation theme are defended.

There is submitted to the defending a dissertation containing the technology of cultivating tissues and cells of some species of the genus *Onobrychis* sp. There have been proposed methods of selection of viable sainfoin protoplasts. The conditions of generating callus cultures and induction of regenerating processes in some perspective from the viewpoint of further selecting sainfoin species have been optimized. Using obtained *in vitro* sainfoin culture as a model for investigation of cell differentiation mechanisms and morphogenesis of the sainfoin enabled to obtain new data on the possibility of correcting these processes by hormones and other components of the nourishing medium. The genus peculiarities of the gen-enzyme system expression of the peroxidase in the culture *in vitro* of the saifoin have been investigated. It is found that some molecular forms of this ferment are specific for definite stages of cell differentiation and morphogenesis, so they can be used as the criteria of the differentiation level (the peroxidase test).

**Key words:** sainfoin, protoplasts, callus tissues, plants-regenerants, morfogenesis markers, gen-enzyme system of peroxidase.

Здано до складання 10.07.97. Підписано до друку 14.07.97.  
Обсяг 1.0 друк. арк. Формат 60x84/16.  
Наклад 100 прим. Папір офсетний. Зам. № 334.

Надруковано у друкарні НВФ "Астропринт"  
м. Одеса, вул. Преображенська, 24, к.13.  
Тел./факс: (0482) 26-98-82.

433928

**AB 38.358**