

A. rhizogenes A4) and transformation frequency was up to 75 % for explants transformed using *pCB161* vector. PCR analysis proved the presence of *nptII*, *ifn- α 2b* and *rolB* genes in marshmallow roots obtained after *A. rhizogenes*-mediated transformation. The clones of transgenic roots differed in fructan synthesis. So the genetic transformation has led to increasing of the level of fructan content up to 41 mg/g dry weight. Fructan content was 13 mg/g dry weight in roots of control untransformed plants. **Conclusions.** Thus, we obtained the transgenic *A. officinalis* “hairy” roots using *A. rhizogenes*-mediated transformation. Extracts from “hairy” root culture were characterized by the higher level of fructan content in comparison with the fructan content in extracts from the roots of control plants.

Key words: genetic transformation, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, *Althaea officinalis* L., fructans.

УДК 633.81:57.085.2

ЕГОРОВА Н.А., СТАВЦЕВА И.В., ЯКИМОВА О.В., КАМЕНЕК Л.И., КРИВОХАТКО А. Г.

Институт сельского хозяйства Крыма НААН Украины,

Украина, 95493, г. Симферополь, ул. Киевская, 150, e-mail: yegorova.na@mail.ru

РОЛЬ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ В ПРОЦЕССЕ ИНДУКЦИИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА *IN VITRO* У ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

Повышение эффективности растениеводства предполагает использование новых методических подходов, в том числе методов клеточной инженерии. Для разработки многих биотехнологий необходимы хорошо воспроизводимые методы получения каллусных культур, которые являются одним из основных объектов биотехнологических манипуляций. И хотя на настоящий момент получение каллусной ткани не представляет существенных сложностей у многих видов растений, тем не менее, у отдельных генотипов нередко возникают проблемы. При этом важно не только достижение высокой частоты индукции каллуса и его хорошей пролиферации, но и получение его из различных типов эксплантов. Происхождение каллусных тканей из разных органов растения влияет на их дальнейшую регенерационную способность, что нужно учитывать при разработке методов создания генетического разнообразия в селекции (индукции соматоклональной вариабельности, клеточной селекции и др.), а также на интенсивность синтеза биологически активных веществ, что важно для альтернативных биотехнологий получения вторичных метаболитов *in vitro* [1, 3]. Разработка таких биотехнологий является актуальной задачей для многих эфиромасличных растений, широко используемых в медицине, пищевой, парфюмерно-косметической промышленности и других отраслях. Для большинства изучаемых нами эфиромасличных растений в литературе имеются данные о получении каллусных культур, используемых в дальнейшем для

индукции морфогенеза, получения суспензий или в исследованиях вторичных метаболитов *in vitro* [5–11]. Их анализ показывает большое разнообразие предлагаемых разными авторами питательных сред, ограниченность используемых типов эксплантов, а также недостаточную изученность многих факторов, лимитирующих процесс каллусогенеза. Представленные в этих публикациях методики получения каллусных культур не всегда воспроизводимы при работе с новыми видами и сортами, что обусловлено влиянием многих экзогенных и эндогенных факторов на индукцию каллусообразования и, прежде всего, генетической обусловленностью этого процесса [3].

Целью нашей работы было изучение влияния некоторых факторов (генотипа и происхождения донорного растения, типа экспланта, сезона, состава питательной среды) на индукцию каллусогенеза у видов и сортов основных и перспективных эфиромасличных растений, возделываемых в Украине.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили ткани и органы эфиромасличных растений: лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) – сорта Степная, Синевя, Вдала, Ранняя, Крымчанка, Галлея, образцы №№ 58-1, 75-11, 61-1; шалфея (*Salvia sclarea* L.) – сорта С-785, С-1122, Тайган; кориандра (*Coriandrum sativum* L.) – сорта Янтарь, Ранний, Мисхор, Нектар, Медун; фенхеля (*Foeniculum vulgare* Mill.) – сорта Мэрцишор, Оксамит Крыма, Крымский; розы эфиромасличной (*Rosa spp.*) – сорта Радуга,

Лань, Крымская Красная, Мичуринка, Весна, Белая, Кооператорка, Свежен, Фестивальная, образцы № 215, №7806, С-13А; тысячелистника (*Achillea millefolium* L., *A. filipendulina* Lam., *A. setacea* Waldst. et Kit., *A. nobilis* L.); мелиссы (*Melissa officinalis* L.) сорт Цитронелла; полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) – № 5р. 24, № бр. 17; монарды (*Monarda fistulosa* L., *M. citriodora* Cerv. ex Lag., *M. didyma* L., *M. x hybrida* hort.). В качестве эксплантов для получения каллусных культур использовали сегменты стебля, листа, черешка, соцветия, зародыши, почки, а также различные органы проростков, полученных из семян *in vitro*. Введение в асептическую культуру и культивирование проводили с применением традиционных биотехнологических методов на различных модификациях среды Мурасиге и Скуга (МС) [2]. Экспланты и каллусы культивировали при +26°C, влажности 70 % и освещенности 600 люкс. В каждом варианте анализировали не менее 20 эксплантов в 3-х кратной повторности, а данные обрабатывали статистически с использованием пакета программ Microsoft Office.

Результаты и обсуждение

При проведении исследований особое внимание мы обратили на использование широкого спектра выращиваемых в Украине сортов и перспективных селекционных образцов, а также различных типов эксплантов. Показано, что практически у всех изученных видов эфиромасличных растений при культивировании большинства анализируемых тканей и органов возможна индукция каллусогенеза. Однако частота этого процесса и характеристика каллусной ткани в значительной степени зависели от многих факторов. Для всех эфиромасличных растений было установлено влияние на индукцию каллусогенеза генотипа – вида, сорта, сортообразца. Разные генотипы порой различались не только по частоте образования каллуса, но и составу оптимальной питательной среды, при этом наблюдалось взаимодействие этих факторов. Так, для 4-х видов тысячелистника при культивировании сегментов листьев было показано, что максимальная частота образования каллуса на большинстве питательных сред была у *A. filipendulina* (100 %) и *A. millefolium*, *A. nobilis* (92–94 %). Меньшей способностью к индукции каллусогенеза характеризовались экспланты *A. setacea*, у которых каллус формировался с частотой до 33 % и отличался очень слабым

приростом. У 3-х видов монарды (*M. fistulosa*, *M. citriodora*, *M. x hybrida*) максимальная частота каллусогенеза из эксплантов листа (66,6–94,7 %) была достигнута при введении в среду 2,4,5-Т (1,0 мг/л) и БАП (0,5 мг/л). В то же время на этой среде у *M. didyma* каллус формировался только у 21,4 % эксплантов. Для этого вида оптимальной была среда МС с добавлением 2,4-Д (1,0 мг/л) и БАП (0,5 мг/л), на которой каллусообразование достигало 68,2 %.

Влияние сортовых особенностей особенно ярко проявилось при введении в культуру *in vitro* лепестков цветков розы эфиромасличной (рис. 1). Установлено, что у большинства сортов и образцов частота каллусообразования составила 70–85 %, хотя у некоторых не превышала 25–40 %, а у № 7806 на испытанных средах каллус не формировался. Выявлены различия генотипов и по потребности в гормонах для индукции каллуса. Так, у сортов Лань и Радуга максимальная частота каллусогенеза отмечена на среде МС с 4,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина, тогда как у ‘Весны’ – с 2,0 мг/л 2,4-Д и НУК и 0,1 мг/л кинетина, а у №215 и С13А – с 2,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. Такие существенные различия по способности к каллусогенезу у изученных сортов розы, по-видимому, объясняются тем, что при их создании часто использовали сложные межвидовые комбинации скрещивания [4]. Для лаванды также была отмечена важная роль генотипа – у сорта Степная и №75-11 частота каллусообразования из листьев достигала 100 %, у сорта Галлея 33,3 %, а у №61-1 каллус на изученных средах не формировался, лишь изредка наблюдали начальные этапы пролиферации.

Установлено, что у некоторых перекрестноопыляющихся растений, в частности у фенхеля, индивидуальные растения в пределах сорта различались между собой по частоте индукции каллуса и интенсивности его роста (рис. 2). У изученных растений частота каллусообразования варьировала от 0 до 100 %, при этом у большинства из них частота индукции каллуса была достаточно высокой – от 72,4 % до 100 %. В то же время у растения № 1 каллус на испытанных средах не образовывался, что свидетельствует о том, что в сортовой популяции фенхеля, в целом характеризующейся высокой способностью к каллусогенезу, могут быть растения, у которых этот признак не проявляется.

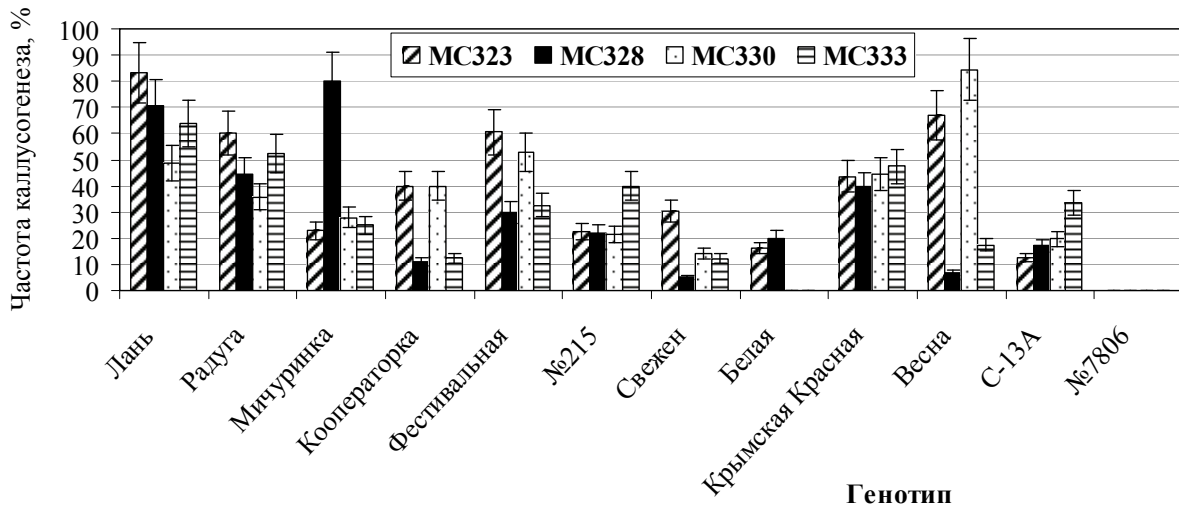


Рис. 1. Влияние генотипа и состава питательной среды на индукцию каллусогенеза у розы эфиромасличной. Гормональные добавки в среде МС (мг/л): МС323 – 2,4-Д (4,0), кинетин (0,5); МС328 – 2,4-Д (2,0), кинетин (0,5); МС330 – 2,4-Д (2,0), НУК (2,0), кинетин (0,1); МС333 – НУК (2,0), БАП (0,5)

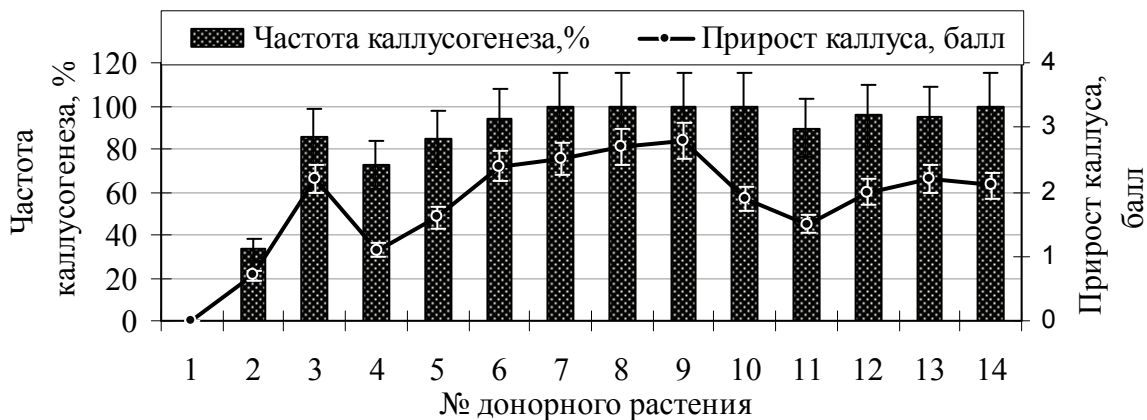


Рис. 2. Влияние генотипа донорного растения фенхеля сорта Мэрцишор на индукцию каллусогенеза *in vitro*

Что касается гормонального состава питательных сред, то для большинства эксплантов у многих изученных видов (лаванда, шалфей, тысячелистник, кориандр, полынь) оптимальным для получения каллуса у многих сортов было сочетание НУК (1–2 мг/л) и БАП (0,5 мг/л). Хотя у фенхеля и мяты лучшие результаты были при использовании 2,4-Д и БАП (0,5–1,0 мг/л), а у монарды – 2,4,5-Т или 2,4-Д и БАП. Как уже указывалось, особенно варьировали составы питательных сред для разных сортов розы (рис. 1).

В результате проведенных исследований установлено, что индукция каллусогенеза возможна у всех изученных типов эксплантов, однако ее частота значительно варьировала, в зависимости от используемого органа и генотипа. Максимальная частота образования

каллуса при введении в культуру *in vitro* вегетативных органов зрелого растения у лаванды, тысячелистника, полыни, монарды была при эксплантации листьев (до 85–100 %), а у фенхеля – стебля (100 %).

Высокую эффективность показало применение в качестве эксплантов органов, изолированных из полученных *in vitro* проростков. Так, при анализе 11 различных типов эксплантов (из вегетативных и генеративных органов растений и проростков) кориандра сорта Янтарь максимальная частота каллусогенеза (100 %) была выявлена у сегментов гипокотыля. У шалфея сорта С-785 все изученные экспланты из проростков (гипокотиль, семядоля, корешок, лист, почка, стебель) продемонстрировали высокую каллусообразующую способность (до 84–

100 %), тогда как частота каллусогенеза из листьев растений закрытого грунта не превышала 35–52 %. У Melissa было исследовано влияние на формирование каллуса из трех типов эксплантов (листа, стебля, черешка) происхождения донорных растений, в качестве которых использовали растения, выращенные в теплице, а также пробирочные растения, полученные из семян *in vitro*. Установлено, что для эксплантов растений, полученных *in vitro*, на большинстве испытанных питательных сред показатели каллусообразования были в 2–2,5 раза выше, чем у эксплантов, выделенных из растений *in situ*. По-видимому, это обусловлено ювенильным состоянием органов проростков и их культивированием на питательных средах, что могло повлиять на уровень эндогенных гормонов, играющих важную роль в процессах пролиферации и дифференциации клеток. Некоторые авторы также указывали на эффективность использования органов проростков в качестве эксплантов у отдельных эфиромасличных видов растений [5, 6, 8, 10]. Получение исходного растительного материала из проростков *in vitro* может быть более предпочтительным, так как осуществимо в течение всего года, а в некоторых случаях способствует не только лучшей индукции каллусогенеза, но и морфогенеза.

Важную роль в индукции процесса каллусогенеза играет физиологическое состояние экспланта и донорного растения, которое зависит от условий выращивания, возраста растения, сезона. На примере лаванды было исследовано влияние времени года, когда проводилось введение в культуру *in vitro*, на способность листовых эксплантов к индукции каллуса. В этом опыте в течение пяти лет анализировали одни и те же исходные растения, выращиваемые в условиях закрытого грунта. Установлено, что в летний период отмечалась наименьшая частота образования каллуса – у изученных трех сортов этот показатель был в 2–2,5 раза ниже, чем в остальное время года.

Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. Учебное пособие. – М.: ФБК – ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полицук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
3. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
4. Назаренко Л.Г. Селекция розы эфиромасличной. – Симферополь: Изд-во ИЭЛР, 1997. – 418 с.

Максимальная частота каллусогенеза (92,2–96,7 % у ‘Степной’, 90,1–90,9 % у ‘Синева’ и 79,5–86,7 % у ‘Вдалой’) выявлена весной и осенью, что может быть связано с активным отрастанием побегов в эти периоды и изменением уровня эндогенных фитогормонов.

Известно, что значительную роль в каллусообразовании играют условия культивирования *in vitro* [1, 3]. В наших экспериментах для лаванды было показано влияние на частоту формирования каллуса ориентации листового экспланта на поверхности питательной среды. Частота каллусообразования на всех изученных средах при помещении листа адаксиальной стороной на агар была в 1,5–2,0 раза выше по сравнению с абаксиальной стороной. В то же время у полыни эстрагон расположение листового экспланта на поверхности среды не влияло на частоту каллусогенеза (в обоих вариантах 100 %), однако при помещении листовой пластинки адаксиальной стороной на агар отмечали индукцию прямого органогенеза с частотой до 23,8 %, тогда как при абаксиальном размещении морфогенез проявлялся в единичных случаях. Выявленная разница пролиферативной и морфогенетической активности в зависимости от расположения экспланта может быть связана с анатомо-морфологическими особенностями строения листовой пластинки и физиологической полярностью, обусловленной градиентом эндогенных физиологически активных веществ.

Выводы

Оптимизированы условия получения каллусных культур у видов и сортов ряда эфиромасличных растений, возделываемых в Украине. Выявлены особенности влияния генотипа, типа экспланта, гормонального состава питательной среды, условий выращивания донорного растения, сезона и расположения экспланта на поверхности питательной среды на индукцию каллусогенеза у лаванды, розы, кориандра, шалфея, фенхеля, полыни, монарды, тысячелистника, Melissa *in vitro*.

5. Anzidei M., Bennici A., Schiff S. et al. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observations of developing embryogenic callus // Plant Cell, Tissue Organ Culture. – 2000. – 61, N 1. – P. 69–79.
6. Figueiredo A.C., Pais M.S. *Achillea millefolium* (yarrow) cell suspension cultures: establishment and growth conditions // Biotechnology Lett. – 1991. – 13, N. 1. – P. 63–68.
7. Ghiorghita G., Maftai D.E., Nicuta D. Some aspects concerning the in vitro reaction of *Lavandula angustifolia* L. // Propag. Ornament. Plants. – 2009. – 9, N 1. – P. 47–49.
8. Iola-Boldura O.M., Radu F., Popescu S., Borozan A. Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.) // Bull. UASVM Hort. – 2010. – 67, N 1. – P. 308–313.
9. Ishioka N., Tanimoto S. Plant regeneration from Bulgarian rose callus // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1990. – 22, N 3. – P. 197–199.
10. Meftahzade H., Lotfi M., Moradkhani H. Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. // African J. of Biotechnology. – 2010. – 9, N 28. – P. 4314 – 4321.
11. Murthy H.N., Hahn E.J., Paek K.Y. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum* L. // Sci. Hort. – 2008. – 118, N. 2. – P. 168–171.

YEGOROVA N.A., STAVTZEVA I.V., YAKIMOVA O.V., KAMENYOK L.I., KRIVCHATKO A.G.

Institute of Agriculture Crimea, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 95034, Simferopol, Kievskaya str., 150, e-mail: yegorova.na@mail.ru

ROLE OF SOME FACTORS IN THE PROCESS OF CALLUSOGENESIS INDUCTION *IN VITRO* IN ESSENTIAL OIL PLANTS

Aims. The influence of some factors on callus formation for main and perspective for growing in Ukraine species of essential oil plants was investigated. **Methods.** Cell, tissue and organ culture *in vitro*, statistics.

Results. The conditions for obtaining callus cultures using a wide range of explants, varieties and samples of essential oil plants – lavender (*Lavandula angustifolia*), sage (*Salvia sclarea*), coriander (*Coriandrum sativum*), fennel (*Foeniculum vulgare*), essential oil rose (*Rosa spp.*), yarrow (*Achillea millefolium*, *A. filipendulina*, *A. setacea*, *A. nobilis*), melissa (*Melissa officinalis*), tarragon (*Artemisia dracunculus*), monarda (*Monarda fistulosa*, *M. citriodora*, *M. didyma*, *M. x hybrida*) have been optimized. The peculiarities of the influence on the callusogenesis of some factors (genotype and donor plant origin, season, hormonal composition of nutrient medium, type of explant and its orientation to the surface of the medium) were revealed. In particular, for fennel variability in the callus formation frequency of plants within ‘Martsishor’ variety (from 0 to 100 %) were detected, for lavender it was shown an increased frequency of callusogenesis at 1.5–2.0 times when leaf placed adaxial side on agar compared with abaxial. **Conclusions.** The important role of some endogenous and exogenous factors in the induction of callus formation in lavender, sage, coriander, fennel, essential oil rose, yarrow, melissa, tarragon, monarda was shown.

Key words: essential oil plants, callusogenesis, explant, *in vitro*.

УДК 633.111.1; 632.4; 661.743.1

ЖУК І.В., ДМИТРИЄВ О.П.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: iren_zhuk@mail.ru

УЧАСТЬ ЦАВЛЕВОЇ КИСЛОТИ В ІНДУКЦІЇ СИСТЕМНОЇ СТІЙКОСТІ ПШЕНИЦІ ДО ЗБУДНИКА СЕПТОРІОЗУ

Грибні захворювання пшениці призводять до значних втрат урожаю. До найбільш поширених грибних хвороб належить септоріоз. Втрати врожаю за помірного розвитку септоріозу становлять 10–15 %, а при епіфітотійному, яке трапляється раз в 2–3 роки – 30–50 % [1] Збудник цього захворювання гриб

Septoria tritici уражує листки пшениці, зменшуючи їх асиміляційну поверхню та здатність до фотосинтезу. Дефіцит фотоасимілятів у свою чергу викликає затримку розвитку колоса, зниження кількості та маси зерен у колосі. Підвищення імунітету рослин до патогенів здійснюється за допомогою