

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 602.6:57.086.86:582.661.21

ІНДУКЦІЯ КАЛЮСОУТВОРЕННЯ І МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ У *AMARANTHUS CAUDATUS* L. (СОРТ HELIOS)

© 2017 р. О. М. Ярошко

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

Метою роботи було індукувати утворення калюсної тканини і мікроклонів *Amaranthus caudatus* L. сорту Helios. Найкращими середовищами для отримання стабільної калюсної культури були такі: Мурасіге і Скуга (MS₃₀) з додаванням 30 г/л сахарози, 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти і 1 мг/л кінетину; MS₃₀ з додаванням 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти і 10% кокосового молока. Для мікроклонального розмноження найефективнішим середовищем було MS₃₀ з додаванням 1 мг/л тїдіазурону.

Ключові слова: *Amaranthus caudatus*, калюсна культура, мікророзмноження

Рослини роду Амарант використовуються в харчовій промисловості (дієтичні хлібо-булочні вироби), медицині (лікування запальних процесів бактеріальної етіології, розладів гормональної системи, раку), косметології (засоби для омолодження шкіри), сільському господарстві (листя, стебла і зерно як корм для тварин) (Biswas et al., 2013).

Амарант є джерелом біологічно активних речовин, найбільш цінними з яких є сквален і амарантин. Сквален має протипухлинні і рано-загоюючі властивості, а амарантин – антиоксидантні (Biswas et al., 2013).

Отримання біологічно цінних речовин можливе за допомогою біотехнологічних методів. Ці речовини можливо одержувати з калюсної тканини. Також калюсна тканина може бути вихідним матеріалом для генно-інженерних маніпуляцій для подальшого покращення сортів.

У попередні роки групи авторів проводили експерименти з отримання калюсу для деяких видів роду *Amaranthus*, на жаль, багато з цих робіт проводилися досить давно (Flores et

al., 1982; Bagga et al., 1987; Bennici et al., 1992; Bennici, Schiff, 1997; Bennici et al., 1997; Jofre-Garfias et al., 1997).

Утворення калюсної тканини у *A. gargenticus* досліджували Amin зі співавторами (Amin et al., 2015). Позитивні результати були отримані на середовищі Мурасіге і Скуга (MS₃₀) з додаванням 30 г/л сахарози (Murashige, Skoog, 1962), 2 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти (НОК) і 1 мг/л 6-бензиламінопурину (БА). Дослідження з калюсоутворення для *A. tricolor* проводили Biswas зі співавторами (Biswas et al., 2013). За їх результатами, найкращім середовищем було MS₃₀, доповнене 0,25 мг/л НОК і 2 мг/л БА. Середовище для *A. paniculatus* добирали Bagga зі співавторами (Bagga et al., 1987), вони отримували калюсну тканину на середовищі В₅ (Гамборга) з 1 мг/л ГА₃ (гіббереллової кислоти), 1 мг/л кінетину (Кін) і 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти (2,4-Д). Для виду *A. cruentus* дослідження проводили Yaacob зі співавторами (Yaacob et al., 2012). Ця група дослідників визначила, що для калюсоутворення *A. cruentus* найефективніше середовище MS₃₀ з додаванням 0,5 мг/л ГА₃ і 0,5 мг/л зеатину (Зеа). Для ліній *Amaranthus caudatus* ефективними були середовища MS₃₀ з 2 мг/л 2,4-Д і 2 мг/л Кін та MS₃₀ з 5 мг/л НОК і 4 мг/л БА (Bennici et al., 1992; Bennici, Schiff, 1997; Bennici et

al., 1997). Для видів *A. hypochondriacus*, *A. cruentus*, *A. tricolor* робота проводилася Flores зі співавторами (Flores et al., 1982). Вони отримували калюсну тканину на MS₃₀ з 1 мг/л 2,4-Д. А Gajdosova і співавт. досліджували утворення калюсної тканини у *A. cruentus* Fichs і *A. hybrid* K-433 (Gajdosova et al., 2007). Для *A. cruentus* Fichs найефективнішим було середовище MS₃₀ доповнене 6 мг/л 2,4-Д, а для *A. hybrid* K-433 – MS₃₀ з додаванням 2 мг/л 2,4-Д і 0,5 мг/л БА. Для *A. hypochondriacus* cv. Azteca, за даними Jofre-Garfias зі співавт. (Jofre-Garfias et al., 1997), оптимальним середовищем виявилось MS₃₀ з додаванням 10 мл/л кокосового молочка і 2 мг/л 2,4-Д.

Незважаючи на те, що роботи з отримання калюсу проводилися починаючи з 50-х років, з видом *A. caudatus* працювала тільки одна група дослідників. До недавнього часу основними напрямками досліджень представників роду Амарант, в Україні були їх селекція та аналіз біохімічного складу. Нами вперше досліджуються українські сорти виду *A. caudatus* в плані утворення калюсу, мікрозмноження та введення в культуру *in vitro*. Нашим завданням було отримання стабільної калюсної тканини, адвентивних бруньок і пагонів. Стабільною калюсна тканина вважається у тому разі, якщо вона не тільки не відмирає протягом півтора місяця при пасажуванні, а і суттєво накопичує біомасу (Biswas et al., 2013).

МЕТОДИКА

Об'єктом досліджень був *A. caudatus* сорту Helios, насіння якого було люб'язно надане співробітниками відділу нових культур Національного ботанічного саду М.М. Гришка НАН України.

Для введення в культуру *in vitro* насіння поверхнево стерилізували в 1% розчині комерційного препарату «Білізна» протягом 12 хв, тричі промивали дистильованою водою, після чого занурювали у 3% розчин перексиду водню на 12 хв. Насіння пророщували в стерильних умовах на живильному агаризованому середовищі Мурасіге і Скуга (MS₃₀) (Murashige, Skoog, 1962) з 30 г/л сахарози при рН 5,7-5,9. Проростки вирощували за температури 22-25°C, з освітленням 3000-4500 лк за 16-годинного світлового фотоперіоду.

Вихідним матеріалом для отримання калюсу були частини гіпокотилія, листових пластинок і коренів завдовжки 1 см, отримані з 7-денних вирощених *in vitro* проростків. Отримані експланти культивували горизонтально

протягом двох тижнів на середовищі MS₃₀, яке містило 30 г/л сахарози (рН 5,7-5,9) з додаванням 6-бензиламінопурину (БА), зеатину (Зеа), 1-нафтилоцтової кислоти (НОК), кінетину (Кін), тїдіазурону (ТДЗ) (N-феніл-N'-(1,2,3-тіадіазол-5-іл) сечовини), 2,4-дихлорфеноксицтової кислоти (2,4-Д), ендосперму кокосового горіха (кокосового молока) у різних співвідношеннях і концентраціях: 0-1 мг/л 2,4-Д і 0-1 мг/л Кін; 0-3 мг/л ТДЗ і 0-0,01 мг/л НОК; 0-1 мг/л НОК і 0-3 мг/л Кін; 0-2 мг/л Зеа і 0-0,2 мг/л НОК; 0-1 БАП; 2 мг/л 2,4-Д і 10% кокосове молочко (10 мл/л). 2,4-Д, НОК – ауксини, які в основному використовують для отримання калюсної тканини, але без додавання невеликої кількості цитокінінів (Кін, БА, Зеа, ТДЗ) ріст калюсів не спостерігають. Тому використовували поєднання і ауксинів і цитокінінів. Зазвичай для отримання калюсної тканини використовують такі концентрації регуляторів росту: ауксини – 1-3 мг/л і цитокініни 0,1-0,5 мг/л. При використанні концентрацій ауксинів більше 5 мг/л найчастіше відбувається пригнічення і відмирання рослинних тканин. На середовищах з концентрацією цитокінінів приблизно у 33 рази більше ніж ауксинів спостерігають формування пагонів. У наших дослідженнях в основному використовувалися концентрації, які вважаються загальноприйнятими (Jofre-Garfias et al., 1997).

Для кожного експерименту використовували по 30 експлантів, дослідження проводили у п'яти повтореннях. Для статистичної обробки результатів використовували програму Statistica (розрахунок критерію Стьюдента (*t*). Рівні значущості (*P*) різниць чи відношень середніх величин визначали за таблицями для малих вибірок.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

З експлантів гіпокотилів на середовищі MS₃₀, яке містило 0-1 мг/л 2,4-Д і 0-1 мг/л Кін, інтенсивно утворювалася калюсна тканина. На рис. 1 представлені результати впливу Кін і 2,4-Д на калюсоутворення.

Калюс утворювався не тільки на частинах гіпокотилія, а й на частинах листової пластинки. Спочатку він був пігментований, з часом (приблизно через тиждень) він ставав світлішим, через 2 тижні набував жовтувато-молочно кольору. Частини листових пластинок майже повністю, а гіпокотилів повністю перетворювалися на пухку калюсну тканину. Найінтенсивніше калюс утворювався на середовищі, яке містило 1 мг/л 2,4-Д і 1 мг/л Кін. Калюсна тканина після пасажів на свіже поживне середовище

ІНДУКЦІЯ КАЛЮСОУТВОРЕННЯ У *AMARANTHUS CAUDATUS*

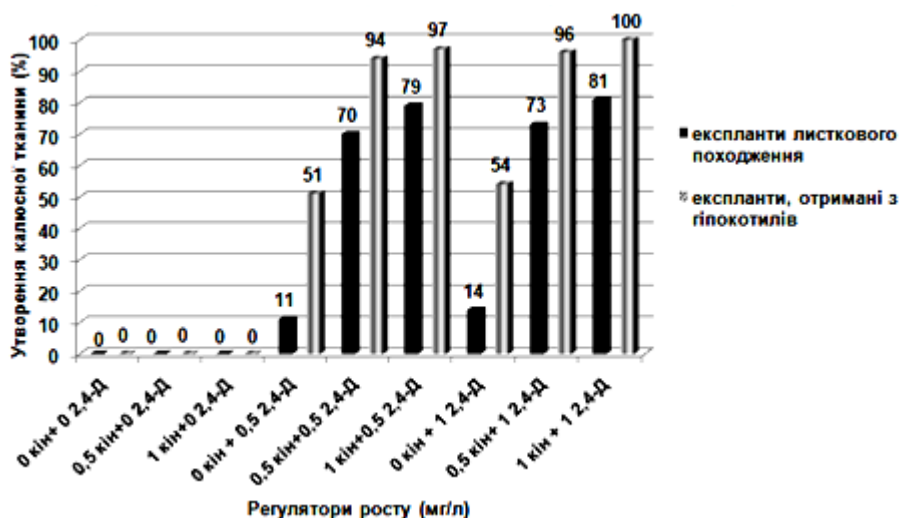


Рис. 1. Ефект кінетину (кін) і 2,4 дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) на калюсоутворення (%) у експлантів, отриманих з листків та гіпокотилів *A. caudatus* сорту Helios.

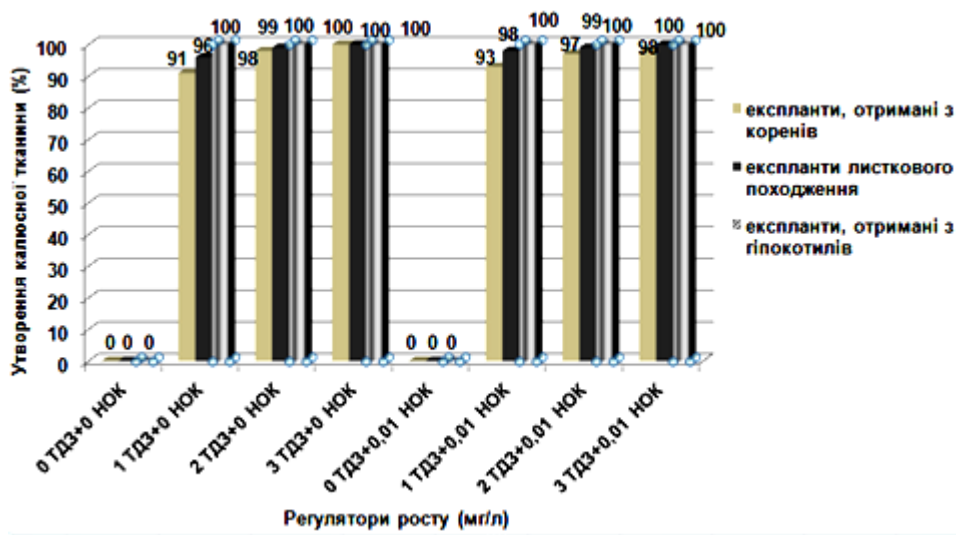


Рис. 2. Ефект тїдазурону (ТДЗ) і 1-нафтилоцтової кислоти (НОК) на калюсоутворення (%) у експлантів, отриманих з коренів, листків, гіпокотилів *A. caudatus* сорту Helios.

продовжувала ріст і накопичення маси. Отже, це середовище може бути використане для отримання стабільної калюсної культури. На середовищі MS₃₀, яке містило тільки 2,4-Д у різних концентраціях, теж утворювалася калюсна тканина, але у меншій кількості, ніж на тих, що містили і 2,4-Д і Кін. На середовищі, в складі якого був тільки Кін, змін не відбувалося. На деяких калюсах, отриманих з гіпокотилів, спостерігали спонтанне утворення коротких одиничних коренів. З експлантів гіпокотилів і листкових пластинок на середовищі MS₃₀, яке містило 0-3 мг/л ТДЗ і 0-0,01 мг/л НОК отримували зеленувату калюсну тканину. На рис. 2 показані отримані результати впливу ТДЗ і НОК на калюсоутворення.

Частини коренів перетворювалися на калюс із зеленими глобулоподібними структурами. Але через 4 тижні калюс (пасажування було через кожні 2 тижні) припиняв ріст, темнішав і відмирав. На середовищі MS₃₀, яке містило тільки ТДЗ, теж спостерігали утворення калюсу, причому на цьому середовищі калюсоутворення було навіть інтенсивнішим, ніж на MS₃₀, що містило і ТДЗ і НОК. Найкраще калюс утворювався на середовищі MS₃₀ з 3 мг/л ТДЗ.

На середовищі MS₃₀ з додаванням різних концентрацій ТДЗ і НОК отримували з апікальної меристеми пагонів розетку з укороченими пагонами (рис. 3). Ці середовища можуть бути використані для мікроклонального розмноження.

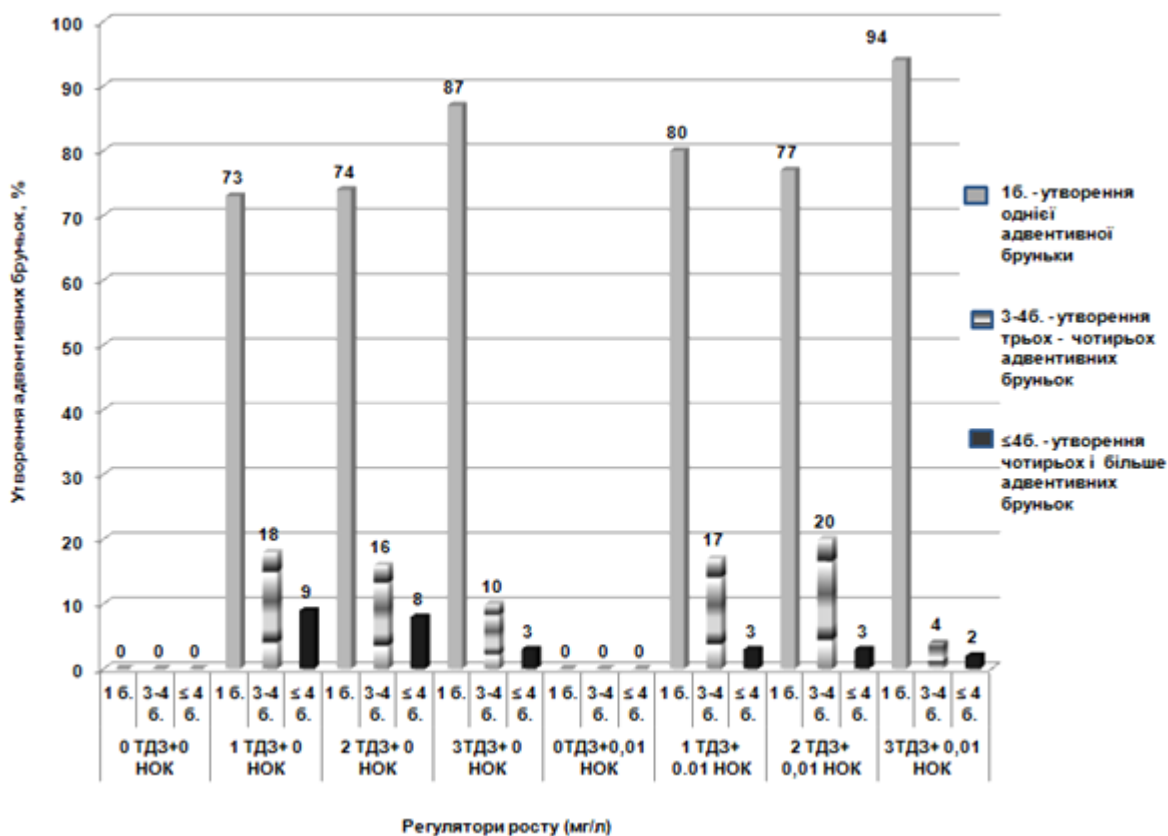


Рис. 3. Ефект тїдазурону (ТДЗ) і 1-нафтілоцтової кислоти (НОК) на утворення адвентивних бруньок (%) у *A. caudatus* сорт Helios.

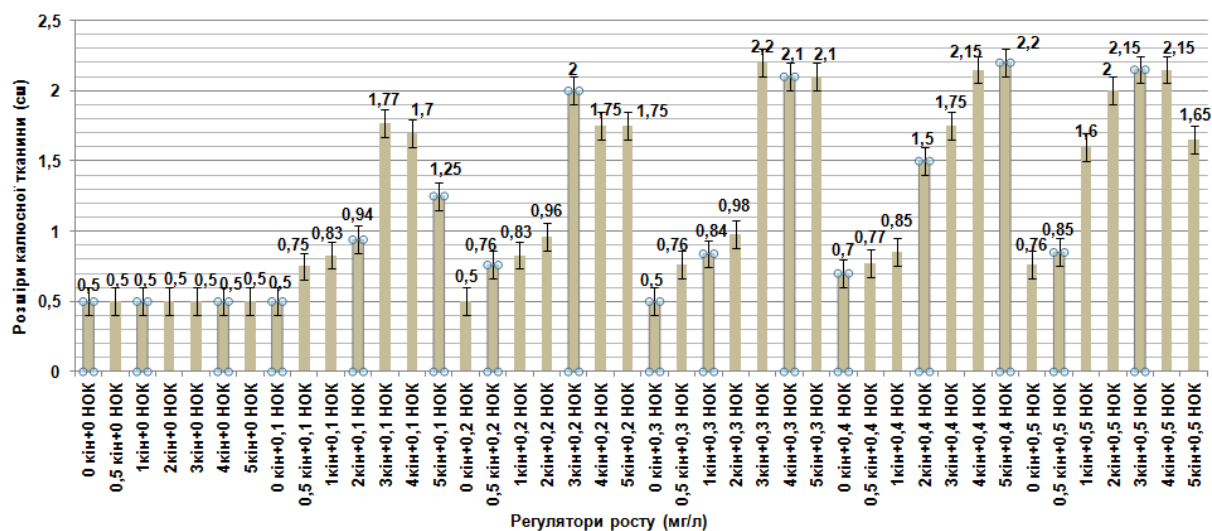


Рис. 4. Ефект кїнетину (кін) і 1-нафтілоцтової кислоти (НОК) на калусоутворення у експлантів, отриманих з гіпокотилів *A. caudatus* сорту Helios.

Найкращім середовищем для мікроклонального розмноження було MS₃₀ з додаванням 1 мг/л ТДЗ (рис. 3).

Отримані укорочені пагони розділяли і пересажували на 2 тижні на середовище MS₃₀ з 1 мг/л БА для подовження, а потім на середо-

вище MS₃₀ або MS₃₀ з 1мг/л НОК для подальшого укорїнення.

З експлантів гіпокотилів і коренів на середовищі MS₃₀ з додаванням 0-1 мг/л НОК і 0-5 мг/л Кїн інтенсивно утворювався жовтуватозеленуватий калус. Але після двох пасажів він припинив розвиток і почав відмирати. З частин

ІНДУКЦІЯ КАЛЮСОУТВОРЕННЯ У *AMARANTHUS CAUDATUS*

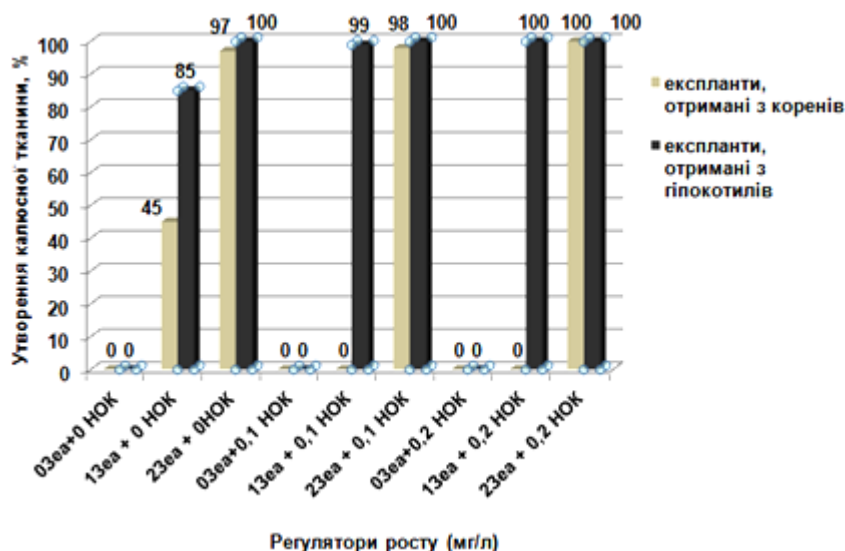


Рис. 5. Ефект зеатину (Зea) і 1-нафтилоцтової кислоти (НОК) на калюсоутворення (%) у експлантів, отриманих з коренів та гіпокотилів *A. caudatus* сорту Helios.

листяних пластинок калюсна тканина не утворювалася. У деяких експлантів гіпокотилів відбувалася регенерація. Результати впливу Кін і НОК на калюсоутворення показані на рис. 4.

Найінтенсивніше калюс утворювався на середовищі MS₃₀ з додаванням 3 мг/л кін і 0,3 мг/л НОК і на MS₃₀, доповненому 5 мг/л кін і 0,5 мг/л НОК. Відмінності були достовірними при $P \leq 0,05$.

З експлантів гіпокотилів і коренів на середовищі MS₃₀ з додаванням 0-2 мг/л Zea і 0-0,2 мг/л НОК інтенсивно утворювалася калюсна тканина. Частина коренів перетворювалися на калюс з зеленими глобулоподібними структурами. Через 4 тижні (пересаджування було кожні 2 тижня) калюс припиняв ріст, темнішав і відмирав. Результати щодо впливу Zea і НОК на калюсоутворення наведені на рис. 5. На середовищі, яке містило тільки Zea, теж утворювався калюс у експлантів, отриманих з гіпокотилів і коренів.

З експлантів гіпокотилів і коренів на середовищі MS₃₀ з 2 мг/л 2,4-Д і 10 % кокосовим молоком отримували стабільну калюсну культуру (100% калюсоутворення). Спочатку калюсна тканина була пігментована. Після двох пасажів пігментація зникала, а ріст калюсу продовжувався. Калюс був жовтуватого кольору і пухкий. Зовнішньо схожий на калюс, отриманий на 1 мг/л 2,4-Д і 1 мг/л Кін.

Високий відсоток утворення калюсу і дуже низька здатність до регенерації у представників роду *Amaranthus* неодноразово відзначалася дослідниками. Flores зі співавт. досліджували здатність до регенерації і калюсоутворення

у таких видів: *A. hypochondriacus*, *A. cruentus*, *A. Tricolor* (Flores et al., 1982). Вважають, що представники роду Амарант самі по собі мають високий вміст ауксинів, тому так важко отримати регенеранти і формування бічних стебел (Flores et al., 1982). Це цілком підтверджують одержані нами результати з мікроклонального розмноження. Для отримання регенерантів було б логічно підбирати такі регулятори росту, які будуть знімати апікальне домінування. Flores зі співавт. вважали, що для калюсоутворення у амарантів було б достатньо використовувати лише цитокиніни (Flores et al., 1982). Але це не підтверджується результатами наших експериментів. Нами були отримані майже однакові результати на середовищі, яке містило однакову концентрацію цитокинінів і ауксинів, і на середовищі, яке містило тільки ауксини.

Незважаючи на те, що досліди з підбору середовищ для калюсоутворення і мікроклонального розмноження видів роду амарант вже проводилися, досі залишаються без належної уваги українські сорти виду *A. caudatus*. Тому оптимізація параметрів культивування калюсу і добір середовищ для мікроклонального розмноження буде важливим етапом для генетичного покращення одного з перспективних сортів *A. caudatus*.

Таким чином, наші дослідження показали, що *A. caudatus* сорту Helios здатний до таких типів морфогенезу: калюсоутворення, формування адвентивних бруньок і пагонів. Калюс утворювався з гіпокотилів, листкових пластинок та коренів, що свідчить про високий морфогенний потенціал цього сорту. Експланти,

отриманні з гіпокотилів, найкраще утворювали калюс.

Найефективнішими середовищами для отримання стабільної калюсної культури були такі: MS₃₀ доповнене 1 мг/л 2,4-Д і 1 мг/л Кін; MS₃₀ з додаванням 2 мг/л 2,4-Д і 10%-го кокосового молока. Для мікроклонального розмноження найефективнішим середовищем було MS₃₀ доповнене 1 мг/л ТДЗ.

ЛІТЕРАТУРА

- Amin M.A.M., Hasbullah N.A., Azis N.A., Daud N.F., Rasad F.M., Lassim M.M. Morphogenesis studies on *Amaranthus gangeticus* in vitro // International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences (AEMS-2015). – 2015. – P. 22-24.
- Bagga S., Venkateswarlu K., Sopory S.K. In vitro regeneration of plants from hypocotyl segments of *Amaranthus paniculatus* // Plant Cell Rep. – 1987. – V. 6. – P. 183-184.
- Bennici A., Schiff S. In vitro culture of species and varieties of four *Amaranthus* L. species // Euphytica. – 1992. – V. 62. – P. 181-186.
- Bennici A., Schiff S. Micropropagation of *Amaranthus* (Amaranth). // Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micropropagation / Ed. Bajaj Y.P.S. – Verlag; Heidelberg; Berlin: Springer, 1997. – V. 39. – P. 20-29.
- Bennici A., Grifoni T., Schiff S., Bovelli R. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus* // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 1997. – V. 49. – P. 29-33.
- Biswas M., Das S.S., Dey S. Establishment of a stable *Amaranthus tricolor* callus line for production of food colorant // Food Sci. Biotechnol. – 2013. – V. 22. – P. 22-30.
- Flores H.E., Their A., Galston A.W. In vitro culture of grain and vegetable Amaranths (*Amaranthus* spp.). // Amer. J. Bot. – 1982. – V. 69. – P. 1049-1054.
- Gajdosova A., Libiakova G., Fejer J. Improvement of selected *Amaranthus* cultivars by means of mutation induction and biotechnological approaches // Breeding of Neglected and Under-Utilized Crops, Spices and Herbs. – Science Publishers, 2007. – P. 151-169.
- Jofre-Garfias A.E., Villegas-Sepulveda N., Cabrera-Ponce J.L., Adame-Alvarez R.M., Herrera-Estrella L., Simpson J. Agrobacterium mediated transformation of *Amaranthus hypochondriacus*: light- and tissue-specific expression of a pea chlorophyll *a/b*-binding protein promoter // Plant Cell Reports. – 1997. – V. 16. – P. 847-852.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
- Yaacob J.S., Hwei L.C., Taha R.M. Pigment analysis and tissue culture of *Amaranthus cruentus* L. // Acta Horticult. – 2012. – V. 958. – P. 171-178.

Надійшла до редакції
24.03.2017 р.

INDUCTION OF CALLUS FORMATION AND MICROCLONAL REPRODUCTION OF *AMARANTHUS CAUDATUS* L. (CV. HELIOS)

O. M. Yaroshko

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
E-mail: 90tigeryaroshko90@gmail.com*

The aim of the work was to induce the formation of callus tissue and microclones of *Amaranthus caudatus* L. the cv. Helios. The best medium for obtaining a stable callus culture was Murasige and Skoog (MS₃₀) supplemented with 30 g/l of sucrose, 1 mg/l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 1 mg/l of kinetin; MS₃₀ supplemented with 2 mg/l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 10% of coconut milk. For microclonal propagation the most effective medium was MS₃₀ supplemented with 1 mg/l of thidiazuron.

Key words: *Amaranthus caudatus*, callus culture, micropropagation

ИНДУКЦІЯ КАЛЮСОУТВОРЕННЯ У AMARANTHUS CAUDATUS

**ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ
И МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ
У AMARANTHUS CAUDATUS L. (СОРТ HELIOS)**

О. Н. Ярошко

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)
E-mail: 90tigeryaroshko90@gmail.com*

Целью работы было индуцировать образование каллусной ткани и микроклонов *Amaranthus caudatus* L. сорта Helios. Лучшими средами для получения стабильной каллусной культуры были: Мурасиге и Скуга (MS₃₀) с добавлением 30 г/л сахарозы, 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 1 мг/л кинетина; MS₃₀ с добавлением 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 10% кокосового молока. Для микроклонального размножения эффективной средой была MS₃₀ с добавлением 1 мг/л тидиазурана.

Ключевые слова: *Amaranthus caudatus*, каллусная культура, микроразмножение