

ОСОБЛИВОСТІ ІНДИВІДУАЛЬНОГО РОЗВИТКУ *NICOTIANA TABACUM* L. ТА ЙОГО ЦИТОПЛАЗМАТИЧНИХ ГІБРИДІВ ПІД ЧАС ВІРГІНІЛЬНОГО ПЕРІОДУ

В.Г. Шевченко, О.М.Царенко, Т.М.Настека

кандидати біологічних наук

Національний педагогічний університет ім. М.П.Драгоманова

Вивчали морфологічну будову проростків, ювенільних та іматурних рослин *Nicotiana tabacum* L. та їх цитоплазматичних гібридів (цибридів) з цитоплазмою *Hyoscyamus niger* L., *H. aureus* L. та *Scopolia carniolica* Jacq. Встановлено, що проростки та ювенільні особини цибридів різних модифікацій різняться за лінійними розмірами органів та строками розвитку, а віргінільний період цитоплазматичних гібридів (крім *N. tabacum* з цитоплазмою *S. carniolica*, та *N. tabacum* (+ *H. niger*) Line Drhn3 x W²) довший, ніж у *N. tabacum* і становить в середньому 109-128 днів.

Ключові слова: *Nicotiana tabacum* L., *Hyoscyamus niger* L., *H. aureus* L., *Scopolia carniolica* Jacq., онтогенез, віргінільний період, цитоплазматичний гібрид.

Інтенсивність та шляхи органоутворення, тривалість життя органів та їх форма визначаються спадковими особливостями організму, а також комплексом дії факторів зовнішнього середовища, що діють на рослину в онтогенезі [9].

Характер та спрямованість біологічних змін в онтогенезі при наявності чужорідних цитоплазматичних генів досконало не досліджені. Вивчення онтогенезу цитоплазматичних гібридів *Nicotiana tabacum* L. порівняно з онтогенезом батьківської форми *N. tabacum* дає можливість глибше зрозуміти механізми дії цитоплазматичних генів. У зв'язку з цим, нами проведено порівняльний аналіз вікових перетворень *N. tabacum* сорту *Wisconsin 38* та його цитоплазматичних гібридів, що проявлялись у змінах структури і функції організму рослин. Морфологічні перетворення, пов'язані з анатомічними, фізіологічними, біохімічними змінами, є показниками вікових станів рослини [11, 12].

В останні десятиріччя завдяки розвитку клітинної біології та генетичної інженерії створено різноманітні незвичайні конструкції ДНК і введено їх у живі, функціонально активні клітини або організми [3, 4, 8, 10]. Завдяки можливості використання генетично змінених рослин відкривається перспектива для поліпшення життя людей, оскільки такі рослини дають вищі врожаї, для їх

вирощування треба менше гербіцидів та паливно-мастильних матеріалів. При створенні цибридів можна накопичувати в рослинах певні корисні речовини і використовувати їх замість рідкісних дикорослих видів. Але застосовувати генетично змінені рослини потрібно з дотриманням правил безпеки відносно довкілля та здоров'я людей [6]. Ці питання регулюються в пункті 3 статті 19 “Конвенції про охорону біологічного різноманіття” [7].

Велику увагу нині приділяють цитоплазматичним гібридам між представниками різних родів та родин, оскільки вони демонструють можливості подолання статевих бар'єрів схрещуваності і клітинного синтезу генетично нових рослин. Створенням і вивченням таких рослинних організмів в Україні займаються в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом Ю.Ю. Глеби [1, 5, 14, 15, 16].

Метою досліджень було вивчення морфологічних особливостей цитоплазматичних гібридів *Nicotiana tabacum* L. (сорт *Wisconsin 38*) під час віргінільного періоду.

Матеріали і методи дослідження. Об'єктами досліджень були *Nicotiana tabacum* L. (сорт *Wisconsin 38*) та цитоплазматичні гібриди *N. tabacum* (+ *Scopolia carniolica*) (4 лінії), *N. tabacum* (+ *Hyoscyamus aureus*) (1 лінія), *N. tabacum* (+ *H. niger*) (4 лінії) з ядрами від *N. tabacum*, а цитоплазмами відповідно від *S. carniolica*, *H. aureus*, *H. niger*. Насіння цих об'єктів надано науковим співробітником відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України кандидатом біологічних наук М.К. Зубком.

Рослини на розсаду вирощували в стандартних ящиках, заповнених сумішшю ґрунту з рівних частин чорнозему, перегною і піску в теплиці при температурі ґрунту +18 - +20 °С. Насіння висівали на глибину 1-1,5 см. Після появи 2-3 пар листків, розсаду пікірували в окремі ящики за схемою 5 x 5 см, через 10-12 днів її підживлювали 10%-вим розчином органічного добрива. Рослини загартовували поступово вентиляцією теплиці й винесенням їх з теплиці для гартування перед посадкою в ґрунт, яку здійснювали за схемою 50 x 50 см у кінці травня – на початку червня при встановленні температури повітря не нижче +20

°С. Поливали їх при тривалій відсутності атмосферних опадів та високих температурах повітря.

Досліджувані рослини вирощували в однакових екологічних умовах на дослідній ділянці біостанції “Татарка” Національного педагогічного університету імені М.П. Драгоманова. Дослідження проводили в польових умовах за методикою Б.О. Доспехова [2]. Спостереження й дослідження здійснювали на модельних рослинах кожного зразка в кількості 25-30 екземплярів, які мали індивідуальні етикетки і розміщувались за схемою, нанесеною на план.

При вивченні онтогенезу рослин застосовували монографічну схему опису виду, запропоновану Й.Й. Сікурою і Л.П. Сиріцею [11], а морфологічний опис рослин здійснювали відповідно до розробок О.О. Федорова, М.Є. Кірпічнікова, З.Т. Артюшенко. [13]. Дані статистично обробляли на ЕОМ за допомогою програми „Microsoft Exel”.

Результати досліджень. Насіння *N. tabacum*, *N. tabacum* (+*S. carniolica*) x *SRI*¹ x *W*⁴ починало проростати на 3-4-ту добу, а у всіх інших дослідних цибридів на 5-7-му добу. Процес проростання насіння розпочинався з його бубнявіння при всмоктуванні води, далі активізувалися ферментативні процеси і зародок почав розвиватись. Зародковий корінь з’явився назовні через мікропілярний отвір. Проростання насіння було надземним. Після розвитку кореня з’явилося зародкове вкорочене стебло з сім’ядолями.

Проростки (*p*) були невеликими, з майже округлими черешковими сім’ядолями. Верхня частина гіпокотилія та частина зовнішньої поверхні сім’ядолей (біля основи пластинки сім’ядольних листків) злегка опушені. Перед початком росту верхівкової бруньки гіпокотиль *N. tabacum* мав довжину $8,26 \pm 0,232$ мм, у всіх інших цитоплазматичних гібридів значно меншу (таблиця). Довжина головного кореня проростків була найбільшою у *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3* x *W*², *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3/max3a* x *W*², *N. tabacum* (+ *S. carniolica*) x *W*⁵. Проростки *N. tabacum* (+ *H. niger*) x *W*² мали невеликі головні корені ($1,8 \pm 0,11$ мм) та пластинки сім’ядольних листків. В умовах захищеного ґрунту бічні корені майже у всіх досліджуваних рослин з’являлися на 6-8-му добу

після проростання насіння, а в *N. tabacum*(+*S. carniolica*) x W^5 , *N. tabacum* (+*S. carniolica*) x SRI^1 x W^4 головний корінь почав галузитися на 9-10-ту добу.

Перший листок у ювенільних рослин (*j*) з'явився через 14-16 діб після проростання насіння, крім *N. tabacum* (+*H. aureus*) *self-fertile*, *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3* x W^2 , *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3/max3* x W^2 , *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3/max3a* x W^2 , у яких перший листок з'явився через 19-22 доби. Він був яйцеподібним або широкояйцеподібним. Сім'ядолі розташовувалися майже паралельно поверхні ґрунту. У цей період сім'ядольні пластинки *N. tabacum*, *N. tabacum* (+*H. aureus*) *self-fertile*, *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3* x W^2 , *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3/max3* x W^2 , *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3/max3a* x W^2 , *N. tabacum* (+ *H. niger*) x W^2 , *N. tabacum* (+ *S. carniolica*) x SRI^1 x W^4 мали довжину 1,8-1,9 мм і ширину 1,1-1,4 мм. У всіх інших цибридів *N. tabacum* з цитоплазмою *S. carniolica* пластинка сім'ядолі була більшою (довжина 2,3-2,6 мм і ширина 2,1-2,3 мм), гіпокотиль – опушений, потовщений і тому перехід від гіпокотіля до кореня достатньо помітний. У цей період коренева система розвивалася інтенсивніше, ніж надземна частина. Довжина головного кореня становила 2,3-3,7 см. Він був тоншим, ніж гіпокотиль, і на ньому вже розвивалися бічні корені першого порядку.

Через 4-7 діб після появи першого справжнього листка з'явився другий листок, а головний корінь досягав 7,2-8,4 см. Обидва листки, як і сім'ядолі, розташувались паралельно до поверхні ґрунту.

Отже, нашими дослідженнями встановлено, що проростки та ювенільні особини різних модифікацій різнилися за лінійними розмірами органів та строками розвитку. Цитоплазматичні гібриди *N. tabacum* з цитоплазмою *H. niger* пізніше утворювали перший справжній листок і мали в цей період менші сім'ядолі, ніж цибриди *N. tabacum* з цитоплазмою *S. carniolica*.

Після 28-32 днів розвитку в дослідних *іматурних рослинах (im)* з'явився третій листок. У цей період змінювалося розташування і структура надземних та

Параметри проростків і сім'ядолей *N. tabacum* L. та його цитоплазматичних гібридів, $M \pm \sigma$

Цибрид	Розміри проростка до початку росту верхівкової бруньки, мм					Розміри пластинки сім'ядольних листків у кінці свого існування, см	
	Гіпокотиль		Головний корінь	Пластинка сім'ядольного листка		довжина	ширина
	довжина	діаметр		довжина	ширина		
<i>N. tabacum</i>	8,26±0,232	0,41±0,008	5,9±0,228	1,47±0,021	0,88±0,034	5,22±0,562	2,66±0,172
<i>N. tabacum</i> (+ <i>S. carniolica</i>) x W^3	3,48±0,328	0,41±0,04	3,92±0,252	1,5±0,089	0,9±0,071	3,96±0,093	3,04±0,112
<i>N. tabacum</i> (+ <i>S. carniolica</i>) x W^4	4,56±0,186	0,36±0,024	5,18±0,432	1,52±0,049	1,08±0,037	3,94±0,098	3,08±0,124
<i>N. tabacum</i> (+ <i>S. carniolica</i>) x W^5	3,9±0,434	0,44±0,024	7,72±0,412	1,72±0,049	1±0,055	3,16±0,098	2,98±0,08
<i>N. tabacum</i> (+ <i>S. carniolica</i>) x $SR1^1$ x W^4	5,04±0,103	0,36±0,02	5,0±0,432	1,48±0,037	0,96±0,051	5,96±0,093	3,98±0,08
<i>N. tabacum</i> (+ <i>H. aureus</i>) <i>self-fertile</i>	4,16±0,264	0,4±0,01	4,28±0,166	1,3±0,055	0,9±0,032	2,8±0,063	1,94±0,024
<i>N. tabacum</i> (+ <i>H. niger</i>) x W^2	5,94±0,147	0,49±0,006	1,8±0,11	1,24±0,024	0,61±0,009	2,34±0,098	2,1±0,17
<i>N. tabacum</i> (+ <i>H. niger</i>) <i>Line Drhn3</i> x W^2	4,86±0,087	0,42±0,02	8±0,152	1,54±0,024	1,02±0,037	2,6±0,032	2,16±0,024
<i>N. tabacum</i> (+ <i>H. niger</i>) <i>Line Drhn3/max3</i> x W^2	3,62±0,351	0,36±0,024	3,12±0,326	1,26±0,093	0,7±0,032	2,76±0,075	2,29±0,04
<i>N. tabacum</i> (+ <i>H. niger</i>) <i>Line Drhn3/max3a</i> x W^2	4,1±0,195	0,36±0,023	6,82±0,153	1,44±0,038	1,04±0,051	2,7±0,032	2,18±0,058

підземних органів. Так, з часом перші 3-4 листки займали висхідне положення відносно поверхні ґрунту (рис. 1).

Поряд з розвитком головного та бічних коренів 1-го, 2-го та 3-го порядків посилено розвивалась надземна частина: інтенсивно росло центральне стебло та

листки, що розташовувалися по спіралі, а також зростала довжина міжвузлів. З кожним наступним ярусом приблизно до середини стебла збільшувалася листкова пластинка, а потім кожен подальший листок був меншим від попереднього. Листки *N. tabacum* набували характерної форми для іматурних рослин: цілокраї, яйцеподібні, сидячі, жолобчасто-вигнуті, з хвилястою поверхнею, темно-зелені, *N. tabacum* (+ *S. carniolica*) x W^3 – еліптичні, а *N. tabacum* (+*H. aureus*) *self-fertile* – еліптичні, черешкові, хлорофілдефектні (рис. 2).

Периметр шийки головного кореня та нижньої частини стебла збільшувався. До початку липня пагін, листки, коренева система *N. tabacum* та цибридів набували характерної для цих рослин форми.

Дуже чіткого переходу об'єктів дослідження з іматурного стану (*im*) у віргінільний (*v*) не спостерігали. Але за 1,5-2 тижні до появи бутонів головного суцвіття ріст стебла у висоту уповільнився. Після цього відновився процес нарощування надземної маси одночасно з органогенезом репродуктивної частини рослин.

Початок розвитку суцвіття відбувався при появі 11-12-го листка у *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3* x W^2 , 16-18-го листка у *N. tabacum*, *N. tabacum* (+ *S. carniolica*) x SRI^1 x W^4 , 20-22-го – у *N. tabacum* (+*S. carniolica*) x W^4 , *N. tabacum* (+*H. aureus*) *self-fertile*, *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3/max3* x W^2 , *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3/max3a* x W^2 , та 24-26-го листка у *N. tabacum* (+*S. carniolica*) x W^3 , *N. tabacum* (+*S. carniolica*) x W^5 , *N. tabacum* (+ *H. niger*) x W^2 . Перехід до генеративного періоду відбувався раніше в *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3* x W^2 , *N. tabacum*, найпізніше – у *N. tabacum* (+ *H. niger*) x W^2 , *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3/max3* x W^2 , *N. tabacum* (+ *H. niger*) *Line Drhn3/max3a* x W^2 .



Рис 1. Іматурні рослини *N. tabacum* (1), *N. tabacum* (+ *S. carniolica*) x W^3 (2), *N. tabacum* (+ *H. niger*) x W^2 (3)



Рис. 2. Хлорофілдефектні листки *N. tabacum* (+*H. aureus*) *self-fertile*

Висновки

Отже, хоча проростання насіння у цитоплазматичних гібридів (крім *N. tabacum* (+ *S. carniolica*) x $SR1^1$ x W^4) настає пізніше, ніж у *N. tabacum*, але розвиток проростків, ріст ювенільних та іматурних рослин проходить інтенсивніше (особливо серед цитоплазматичних гібридів модифікації *N. tabacum* (+*S. carniolica*)). Перехід до генеративного періоду в цибридів *N. tabacum* з цитоплазмою *S. carniolica* та у цитоплазматичного гібрида *N. tabacum* (+ *H. niger*)

Line Drhn3 x W^2 відбувається майже одночасно з *N. tabacum* – через 94-98 днів. Віргінійський період цитоплазматичних гібридів інших модифікацій довший і становить в середньому 109-128 днів.

Список літератури

1. Глеба Ю.Ю. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений / Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник – К.: Наукова думка, 1982. – 104 с.
2. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта /Б.А. Доспехов – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
3. Ермишин А.П. Использование в селекции соматических гибридов между дигаплоидами картофеля *Solanum tuberosum* L. и дикими диплоидными видами из Мексики: получение и беккроссирование дигаплоидов соматических гибридов / А.П. Ермишин, О.В. Маханько, Е.В. Воронкова // Генетика. – 2006. – Т. 42, №12. – С. 1674–1683.
4. Ермишин А.П. Получение диплоидного селекционного материала картофеля на основе соматических гибридов между дигаплоидами картофеля *Solanum tuberosum* L. и дикими диплоидными видами из Мексики *Solanum bulbocastanum* Dunal. / А.П. Ермишин, О.В. Маханько, Е.В. Воронкова // Генетика. – 2008. – Т. 44, №5. – С. 645–654.
5. Возникновение новых геометрических форм ЦМС у гибридов *Nicotiana* (+ *Hyoscyamus*) и *Nicotiana* (+ *Scopolia*), сконструированных посредством слияния протопластов / [М.К. Зубко, Е.И. Зубко, Ю.Ю. Глеба, О. Шидер] // Генетика. – 1995. – Т. 31, №10. – С. 1404–1412.
6. Конвенция о биологическом разнообразии: Текст и приложения / ЮНЕП. – Женева: ЮНЕП, 1995. – 34 с.
7. Національна доповідь про стан навколишнього природного середовища в Україні у 2000 році / В.Романчук (уклад.). Міністерство екології та природних ресурсів України. – К.: Видавництво Раєвського, 2001. – 184 с.
8. Отримання міжтрибних соматичних гібридів *Brassica juncea* + *Arabidopsis thaliana* та дослідження поведінки трансгенних ознак/ [О.О.Овчаренко, І.К. Комарницький, М.Н. Череп та ін.] // Цитология и генетика. – 2004. – 38, № 3. – С.3–8.
9. Серебряков И.Г. Экологическая морфология растений. Жизненные формы покрытосеменных и хвойных.[Учеб. пособие для гос. ун-тов, пед. и лесотехн. Вузов СССР] / И.Г. Серебряков – М.: Высшая школа, 1962. – 378с.
10. Соматическая гибридизация паслёновых / [В.А. Сидоров, Н.М. Пивень, Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник.] – К.: Наукова думка. – 1985. – 132 с.
11. Сикура И.И., Сырица Л.П. Рекомендации по изучению онтогенеза интродуцированных растений в ботанических садах СССР / И.И. Сикура, Л.П. Сырица – К.: Из-во АН УССР, 1990. – 185 с.
12. Уранов А.А. Онтогенез и возрастной состав популяций (вместо предисловия) / А.А. Уранов // Онтогенез и возрастной состав популяций цветковых растений: Сб. науч. трудов. – М.: Наука, 1967. – С. 3–17.

13. Федоров А.А. Атлас по описательной морфологии высших растений. Стебель и корень / А.А. Федоров, М.Э. Кирпичников, З.Т. Артюшенко – М., Л.: Наука, 1962. – 352 с.
14. Functional cybrid plants of *Lycopersicon peruvianum* var 'dentatum' with chloroplasts of *Lycopersicon esculentum*. / [Kochevenko A., Ratushnyak Y., Kornyeuev D., et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2000. – V. 19. – P. 588–529.
15. Functional cybrid plant possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome / [S.G. Kushnir, L.R. Schlumukov, N.J. Pogrebnyak, et al.] // *Mol. Gen. Genet.* – 1987. – Vol. 209. – P. 159–163.
16. Cybrid production based on mutagenetic inactivation of protoplasts and rescuing of mutant plastids: potato with a plastome from *S. bulbocastanum* and *S. Pinnatisectum* / [V.A. Sidorov, D.P. Yevtushenko, A.M. Shakhovsky, Y.Y. Gleba] // *Theor. Appl. Genet.* – 1994. – Vol. 88. – P. 525–529.

ОСОБЕННОСТИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ NICOTIANA TABACUM L. И ЕГО ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ ВО ВРЕМЯ ВИРГИНИЛЬНОГО ПЕРИОДА

В.Г. Шевченко, О.М. Царенко, Т.М. Настека

*Изучали морфологическое строение проростков, ювенильных и иматурных растений *Nicotiana tabacum* L. и его цитоплазматических гибридов (цибридов) с цитоплазмой *Hyoscyamus niger* L., *H. aureus* L. и *Scopolia carniolica* Jacq. Установлено, что проростки и ювенильные особи гибридов различных модификаций отличаются линейными размерами органов и сроками развития. Виргинильный период цитоплазматических гибридов (кроме *N. tabacum* с цитоплазмой *S. carniolica*, и *N. tabacum* (+ *H. niger*) Line Drhn3 x W²) длиннее, чем у *N. tabacum* и составляет в среднем 109-128 дней.*

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum* L., *Hyoscyamus niger* L., *H. aureus* L., *Scopolia carniolica* Jacq., онтогенез, виргинильный период, цитоплазматический гибрид.

CHARACTERISTICS OF INDIVIDUAL DEVELOPMENT OF NICOTIANA TABACUM L. AND ITS CYTOPLASMIC HYBRIDS DURING THE VIRHINILNIY PERIOD

V.G. Shevchenko, O.M. Tsarenko, T.M. Nasteka

*We studied the morphological structure of seedlings, juvenile and imatur plant s of *Nicotiana tabacum* L. and its cytoplasmic hybrids (tsybrydiv) with the cytoplasm of *Hyoscyamus niger* L., *H. aureus* L. and *Scopolia carniolica* Jacq. It was found that seedlings and juvenile individuals of tsybryds of various modifications differ in linear dimensions of development and maturity. Virhinilnyy period of cytoplasmic hybrids (except *N. tabacum* with the cytoplasm of *S. carniolica*, and *N. tabacum* (+ *H. niger*) Line Drhn3 x W²) is longer than of *N. tabacum* and lasts 109-128 days in average.*

Key words: *Nicotiana tabacum* L., *Hyoscyamus niger* L., *H. aureus* L., *Scopolia carniolica* Jacq., ontogeny, virhinilniy period, cytoplasmic hybrid.