

КАЛУСОГЕНЕЗ ЕКСПЛАНТІВ СІМ'ЯДОЛЕЙ *CUCURBITA PEPO VAR. GIRAUMONTI* В КУЛЬТУРІ *INVITRO* ПІД ВПЛИВОМ N-ГЕКСАНОІЛ-L-ГОМОСЕРИНЛАКТОНУ

О. П. ТАРАН, кандидат біологічних наук, старший викладач кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки
Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: oksana.taran258@gmail.com,

Л. М. БАБЕНКО, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України
E-mail: lilia.babenko@gmail.com,

О. В. МОШИНЕЦЬ, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

С. П. РОГАЛЬСЬКИЙ, кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник

Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України

О. В. ЛОБОВА, кандидат біологічних наук, доцент кафедри молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки

О. В. МАЦКЕВИЧ, студентка* факультету захисту рослин, біотехнологій та екології

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Анотація. Регенерація експлантів та стимуляція калусогенезу є актуальними задачами сучасної біотехнології рослин. В даній роботі досліджується фітостимулюючий ефект молекули класу ацилгомосеринлактонів (АГЛ), найпоширенішого класу бактеріальних сигнальних молекул, які задіяні у дистанційній трансдукції сигналів між бактеріями-колонізаторами фітосфери і безпосередньо між бактеріями і рослиною. Метою роботи було оцінити ефект обробки коротколанцюговим АГЛ – N-гексаноїл-L-гомосеринлактоном [ГГЛ] експлантів сім'ядоль кабачка *Cucurbita pepo var. giraumonti* на калусогенез в умовах *invitro*. Обробку розчином ГГЛ та ДМСО (розчинник) проводили в асептичних умовах, занурюючи експланти в розчини речовин на 30 хв. Експланти сім'ядоль рослин, які культивувалися *invitro*, висаджували на агаризоване живильне середовище для калусогенезу і культивували за відсутності світла при температурі 25 °C. У експерименті всі експланти формували пухкий калус кремового кольору. У експлантів, оброблених ГГЛ, встановлено значне збільшення сирої та сухої маси калусів. Проліферація калуса у варіанті із застосуванням ГГЛ починалася на кілька днів раніше, ніж в контрольному варіанті. Враховуючи позитивний ефект застосування ГГЛ на проліферацію і ріст калусної культури на першому

* Науковий керівник – кандидат біологічних наук, старший викладач О.П.Таран

етапі калусогенезу у експлантів кабачка, перспективними є подальші дослідження стимулюючих ефектів АГЛ, зокрема, для оптимізації протоколів культури *in vitro* та створення ефективних систем регенерації.

Ключові слова: *Cucurbita pepo* var. *giraumonti*, калусогенез, N-гексаноїл-L-гомосеринлактон, фітостимулятори, калус, культура рослин *in vitro*

Актуальність. Культивування рослин *in vitro* є однією зі стадій технології селекції рослин, що застосовуються для покращення харчової цінності та підвищення урожайності рослин [30], створення надпродуцентів фармацевтично цінних біологічно-активних речовин [9], для одержання рослин із ефективною здатністю протистояти біотичним або абіотичним стресорам [36, 17, 30; 29]. Останні розробки в галузі біотехнології відкрили кілька способів селекції рослин за допомогою трансформації, за якої гетерологічні гени можуть бути введені в існуючі сорти [4, 19]. Однак у багатьох випадках відсутність ефективної системи регенерації обумовлює обмеження використання технологій переносу генів для культурних рослин. Отже, методи регенерації рослин мають важливе значення для трансформації та одержання, а також для розмноження *in vitro* шляхом вибору соматоклональної варіації та соматичної гібридизації [20]. Тому для застосування різноманітних технологій культивування рослин *in vitro* важливим є розробка надійних систем регенерації експлантів.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Калусогенез, як правило, є першим етапом введення рослинних клітин в культуру *in vitro*. Цей процес є результатом дедиференціації та активного росту клітин і в природних умовах виникає у рослин при різноманітних пошкодженнях. Відповідно, окрема клітина, введена в умови культивування *in vitro*, зберігає свою основну генетичну інформацію про цілий організм і при наявності відповідних умов може реалізувати її. Численні роботи з культивування *in vitro* свідчать, що до калусоутворення здатні будь-які клітини рослини [13], однак успіх калусогенезу залежить від значної кількості чинників, серед яких вплив складу живильного середовища, вміст у ньому стимуляторів росту, стан експланта, умови культивування. Разом з тим, виявлений такий феномен, як втрата здатності до проліферації калусу диференційованих тканин органів рослини із віком [6-8].

Система регенерації рослин з окремих експлантів має важливе значення для генної інженерії [31]. Для рослин родини Гарбузових (*Cucurbitaceae*) генетична трансформація застосовувалась з різноманітними цілями, наприклад, для одержання покращених форм видів, що використовуються як підвої кавуна і огірка [21, 14], для підвищення стійкості рослин огірка до вірусів, які передаються через ґрунт [16], а також для створення стійких форм до вірусної інфекції [28]. Регенераційна здатність рослин значною мірою детермінована генотипом, тому необхідно розробляти відповідні протоколи регенерації *in vitro* для кожного сорту. Основна технологія регенерації все ще потребує розробок для підвищення регенераційної здатності і калусогенезу експлантів рослин родини Гарбузових [18, 22].

Прояв калусоутворюючої здатності *in vitro* залежить не тільки від генотипу рослини і наявності певних генів, але і від їх стану. Тобто, в аналогічних умовах експланти від рослин одного й того самого виду залежно від віку, фізіологічного стану, умов вирощування рослин, тканинної приналежності експланта і стадії його онтогенезу відрізнятимуться інтенсивністю калусоутворення [6].

Ацилгомосеринлактони [АГЛ] – найпоширеніший клас сигнальних молекул бактеріального походження [1, 32]. Саме ці речовини є комунікативними медіаторам, що регулюють своєрідну сенсорну міжклітинну взаємодію у бактеріальній популяції, що дістала назву «почуття кворуму» (ПК), або quorum sensing [1, 12, 25]. На сьогодні ПК-регуляцію виявлено більш як у 500 видів бактерій [5], а також з'ясовано, що системи ПК відіграють ключову роль в регуляції більшості метаболічних та фізіологічних процесів у бактеріальній клітині та з його участю відбувається взаємодія між бактеріями і рослинами [1, 9, 15]. Наразі дані щодо впливу АГЛ на різні рослини є досить обмеженими. Так, показано, що екзогенна обробка АГЛ змінювала співвідношення між вільними ауксинами та цитокінінами в тканинах коренів і пагонів, що супроводжувалась посиленням росту. У модельному досліді молекула системи ПК L-оксодеканоїл-N-гомосеринлактону посилювала базіпетальний транспорт ауксину, результатом якого було накопичення H_2O_2 і NO, а також стимуляція зростання додаткових коренів [11]. У роботах інших авторів повідомлялося про зміни профілю експресії генів у рослин після обробки розчинами АГЛ [24,27,34,35]. Так, N-бутаноїл-L-гомосеринлактон і N-гексаноїл-L-гомосеринлактон [ГГЛ] посилювали ріст коренів у арабідопсиса [35]. N-деканоїл-L-гомосеринлактон індукував формування кореневих волосків у арабідопсиса, впливав на архітектуру коренів подібно ауксину, однак за ауксине незалежним шляхом [27]. Виявлено імуномодулююча активність високомолекулярних АГЛ, яка приводила до значного зростання резистентності до бактеріальних і грибних патогенів у рослин [32, 33].

Отже, молекули класу АГЛ здатні безпосередньо впливати на рослини та мають фітостимулюючу та імуномодулюючу активність. Тому, АГЛ можуть бути задіяні у вирішенні біотехнологічних задач, зокрема, регенерації експлантів та стимуляції калусогенезу *in vitro*.

Мета нашого дослідження – з'ясування впливу обробки ГГЛ на калусогенез експлантів сім'ядолей *Cucurbita pepo* var. *giraumonti* сорту Білий та обґрунтування можливості застосування його в культурі рослин *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження. ГГЛ було отримано шляхом хімічного синтезу, як це було зроблено раніше [2]. Стоковий розчин ГГЛ у ДМСО (SigmaAldrich) містив 2,5 мг / мл. Робочий розчин ГГЛ готували шляхом розведення стокового розчину дистильованою водою у 100 разів, концентрація робочого розчину становила 25 мкг / мл. Для обробки експлантів робочий розчин стерилізували, пропускаючи через шприцевий фільтр з нітроцелюлозною мембраною, вільною від поверхнево-активних речовин, з розміром пор 0,2 мкм Minisart® NML (Sartorius, ФРН). Середовище для культивування експлантів готували за прописом Мурашиге і Скуга [26] з додаванням 0,0005 г / л 2,4-Д (SigmaAldrich), 0,002 г / л IOK (SigmaAldrich), 0,002 г / л кінетину (Sigma Aldrich) і 20 г / л сахарози (Sigma Aldrich).

Середовище містило 8 г/л агар-агару (DIFCO), pH 5,8. Стерилізацію середовища проводили автоклавуванням протягом 25 хв за температури 121 °С, тиск становив 1,2 атм.

Експланти отримували з насіння *C. peregrina* var. *giraumontii* сорту Білий, яке пророщували в асептичних умовах. Сім'ядолі відділяли від стебла і розділяли на експланти, середня вага експланта становила $0,01 \pm 0,005$ г. Експланти занурювали у розчин ГГЛ на 30 хв, у контролі експонування проводили у дистильованій воді і розчині ДМСО (1 %). Всі процедури проводили за асептичних умов в ламінарному боксі. В подальшому експланти культивували за температури 25 °С в темноті. Оцінку калусогенезу проводили на 3, 5, 8 і 12 добу культивування за приростом маси. Кожна дослідна група мала по 10 повторів. Після припинення експерименту, всі експланти було висушено та зважено суху масу.

Статистичну обробку проводили за допомогою *t*-тесту з пакету аналізу програми Excel 2016.

Результати дослідження та їх обговорення. Бактеріальні сигнальні системи з певними припущеннями можна вважати найдревнішим прототипом складних регуляторних систем вищих організмів (гормональної та імунної), що використовують медіатори для координації функцій різноманітних типів клітин із метою досягнення адекватної адаптаційної реакції на рівні тканин, органів та організму в цілому. У наших попередніх роботах [2] показано позитивний ефект праймування корткостероїдом АГЛ – ГГЛ насіння пшениці *Triticum aestivum*, а саме зафіксовано збільшення продуктивного кущіння, кількості і маси зерен в одному колосі, загальної біомаси рослин, надземної вегетативної маси і маси зерна, а також маси 1000 зерен. В роботах інших дослідників показано, що обробка АГЛ змінювала співвідношення ауксинів і цитокінінів в коренях і пагонах *Vigna radiata*, що супроводжувалось посиленням ростових процесів [11]. Після праймування сумішшю АГЛ, що продукуються симбіотичною азотфіксуючою бактерією *Sinorhizobium meliloti*, в рослинах люцерни були ідентифіковані білки, що задіяні в метаболізмі ауксина, а також білки, які беруть участь у формуванні захисних реакцій, енергетичних і метаболічних процесах [24]. Таким чином, ГГЛ зокрема, та деяким іншим АГЛ властива здатність до посилення росту/фітостимуляції.

Калусогенез є феноменом, що безпосередньо зв'язаний із здатністю рослинних клітин до розмноження та росту. Зазвичай у калусогенезі визначають три етапи формування, на першому з яких спостерігається розростання клітин експланта і збільшення їх кількості. В подальшому маніпуляції з одержаною масою клітин направлені на органогенез стебла і коренів. Задача нашого дослідження полягала у дослідженні впливу екзогенної обробки експлантів розчином ГГЛ на перший етап калусогенезу.

Початок видимих змін у калусогенезі експлантів *C. peregrina* var. *giraumontii* сорту Білий за умов екзогенної обробки ГГЛ спостерігали на 3 добу культивування, у контрольному варіанті – через 5 діб, як і у варіанті з ДМСО. Приріст сирової маси калусу у варіанті із застосуванням ГГЛ перевищував контроль на 3 добу культивування у 2,4 раза, на 8 добу – 7,4 раза, і на 12-ту добу – 8,5 раза (рис. 1).

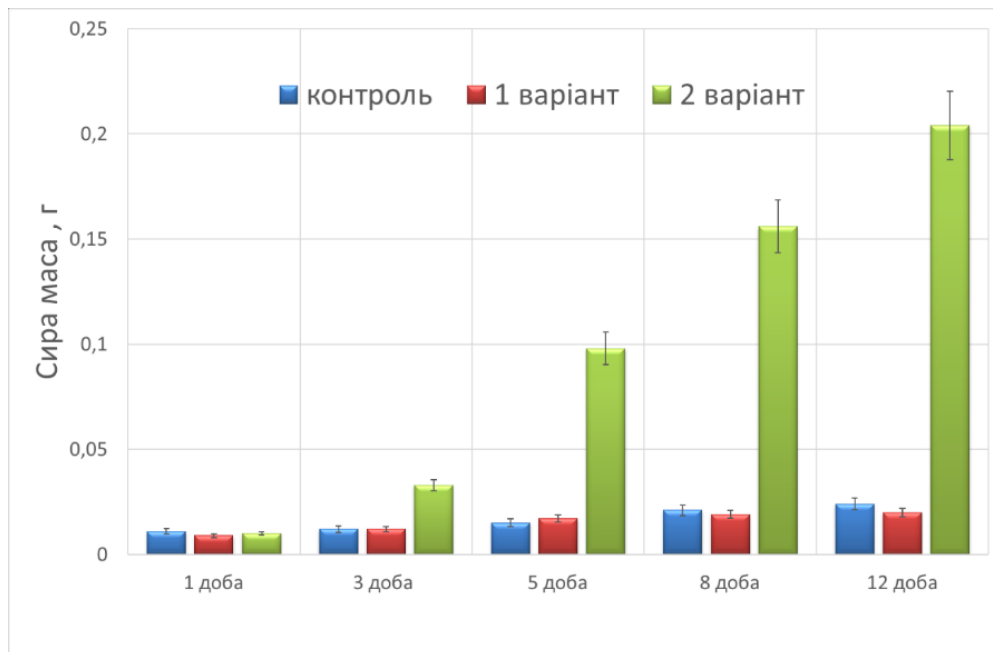


Рис. 1. Динаміка накопичення сирої маси калусу, що утворився з експлантів сім'ядолей *Cucurbita pepo* var. *giraumonti*, сорту Білий. Статистична достовірність у порівнянні із обробкою водою та 1 % ДМСО, * $p < 0.001$**

Різниці між контрольним варіантом і варіантом з розчином ДМСО не виявлено. Вміст сухої речовини в калусах на 12 добу експерименту становив для контролю – $0,0017 \pm 0,0001$ г / калус, для варіанту із ДМСО – $0,0016 \pm 0,0002$ г / калус, для варіанту з - ГГЛ – $0,021 \pm 0,004$ г / калус. Таким чином, обробка експлантів ГГЛ сприяла підвищенню сухої ваги калусів майже у 100 разів.

Відомо, що морфологічна та структурна різноякісність калусів зумовлена присутністю в них різних типів тканин, а також відзначають зв'язок морфології калусів з їх здатністю до регенерації рослин [3]. У досліді експланти формували пухкий калус кремового кольору як у варіантах із обробкою ГГЛ, так і у контролі (рис. 2).

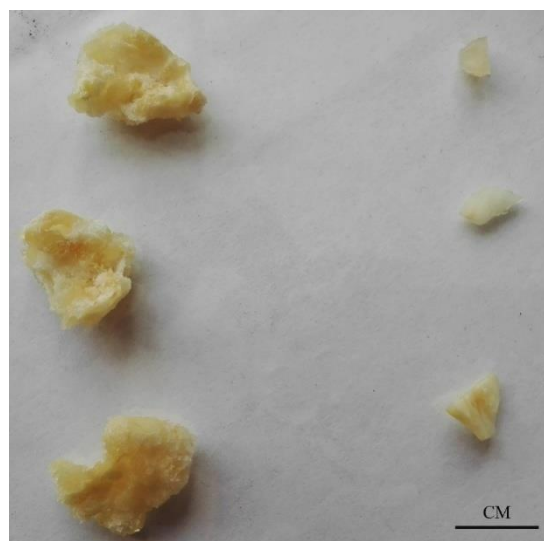


Рис. 2. Калусогенез експлантів кабачка *Cucurbita pepo* var. *giraumonti*, сорту Білий: порівняння розмірів калусу на 12 добу культивування (ліворуч – обробка ГГЛ, праворуч – контроль)

Висновки і перспективи. Таким чином, виявлено, що обробка розчином бактеріальної сигнальної медіатору ГГЛ сприяла активному росту калусу експлантів кабачка *Cucurbita pepo* var. *giraumonti*, сорту Білий на першому етапі культивування *in vitro*. Враховуючи позитивний ефект застосування ГГЛ на проліферацію і ріст калусної культури на першому етапі калуогенезу у експлантів кабачка, перспективними є подальші дослідження із застосування речовин такого класу з метою з'ясування механізму їх впливу для оптимізації культури рослин *in vitro*.

Робота підтримана грантом Національної академії наук України в рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості і сільського господарства».

References

1. Babenko, L. M., Shherbatyuk, M. M., Moshynecz, O. V., Kosakivska, I. V. (2016). Acylgomoserynlaktony bakteriálníhoo pòxodzhennya u biotekhnologiyi prajmuвання рослин: dosyagnennya i perspektyvy vykorystannya v agrarnomu vyrobnyctvi [Acylgomoserlinactones of bacterial origin in biotechnology of plant priming: achievements and perspectives of use in agrarian production]. Plant Physiology and Genetics. 48 (6), 463–474. Available at: http://nbuv.gov.ua/UJRN/FBKR_2016_48_6_3
2. Babenko, L. M., Moshynecz, E. V., Rogalskyj, S. P., Shherbatyuk, N. N., Suslova, O. S., Kosakovskaya, Y. V. (2017). Vlyanye predposevnogo prajmyrovanyya N-geksanoyl-L-gomoserynlaktonom na formyrovanye ryzosfernoj mykroflori y strukturu urozhajnosti Triticum aestivum L. [Influence of presowing priming with N-hexanoyl-L-homoserine lactone on the formation of rhizosphere microflora and yield structure of Triticum aestivum L]. The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology, 1, 106-118.
3. Zhuravlev, Yu. N., Omel'ko, A. M. (2008). Morfogenz rastenyj in vitro [Plant morphogenesis in vitro]. Plant Physiology, 55(5), 643-664.
4. Ignatova, S. A. (2011). Kletochnyye tekhnologi v rasteniyevodstve. genetike i selektsii vzdelyvayemykh rasteniy: zadachi. vozmozhnosti. razrabotki sistem in vitro [Cell technologies in crop production, genetics and selection of cultivated plants: tasks, opportunities, development of systems in vitro]. Odesa: Astroprint, 224.
5. Kreteczka, S. L., Nesterenko, A. M. (2007). Autoindukciya ta sygnalna transdukciya: komunikatorni systemy v mikrobnix populyaciyax [Autoinduction and signal transduction: communicative systems in microbial populations]. Annals Mechnicov Inst, 1, 4-9.
6. Kunax, V. A. (2005). Biotekhnologiya likarskyx roslyn. Genetychni ta fiziologo-bioximichni osnovy [Biotechnology of medicinal plants. Genetic and physiological and biochemical bases]. K: Logos, 730.
7. Kunax, V. A. (1997). Genomnaya yzmenchivost somaticheskix kletok rastenyj. 3. Kallusoobrazovaniye in vitro [Genomic variability of plant somatic cells. 3. Callus formation in vitro]. Biopolymers and cell, 13(5), 362-371.
8. Kushnir, G. P., Sarnaczka, V. V. (2005). Mikroklonal'ne rozmnozheniya roslyn [Microclonal propagation of plants.]. K: Naukova dumka, 271.
9. Luchakivskaya, Yu. S., Olevinskaya, Z. M., Kischenko, E. M., Spivak, N. Ya., Kuchuk, N. V. (2012). Poluchenie kulturyi «borodatyyh» korney, kallusnyih i suspenzionnyih kletochnyih kultur morkovi [Daucus carota L.], sposobnyih ekspressirovat chelovecheskiy interferon alfa-2b [Obtaining a culture of "bearded" roots,

callus and suspension cell carrot cultures [*Daucus carota* L.] capable of expressing human interferon alpha-2b]. *Cytology and genetics*, 46(1), 18-26.

10. Moshy`necz`, O. V., Kosakivs`ka, I. V. (2010). *Ekologiya fitosfery`*: rosly`nno-mikrobni vzayemovidnosy`ny`. 2. Fitosfera yak ekologichna nisha rosly`nno-mikrobny`x vzayemovidnosy`n. funkcional`na akty`vnist` mikroorganizmiv ta yixnij vplyv na rosly`ny` [Ecology of the phytosphere: vegetative-microbial interrelations. 2. Phytosphere as an ecological niche of plant-microbial interrelations. functional activity of microorganisms and their influence on plants]. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*, 21(3), 6-22.

11. Bai, X., Todd, C. D., Desikan, R., Yang, Y. (2012). N-3-oxo-decanoyl-L-homoserinelactone activates auxin-induced adventitious root formation via hydrogen peroxide- and nitric oxide-dependent cyclic GMP signaling in mung bean. *Plant Physiol*, 158, 725–736.

12. Bassler, B. (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, 109, 421–424.

13. Benderradji, L., Brini, F., Kellou, K., Ykhelf, N., Djekoun, A., Masmoudi K., Bouzerour H. (2012). Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat [*Triticum aestivum* L.] genotypes under saline and heat stress conditions. *ISRN Agronomy*, article ID 367851. doi:10.5402/2012/367851

14. Compton, M. E., Gray, D. J., Gaba, V. P. (2004). Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 231–243.

15. Copley, J. (2000). Ecology goes underground. *Nature*, 406, 452–454.

16. Gal-On, A., Wolf, D., Yehezkel, A., Patlis, L., Ryu, K. H., Min, B. E., Pearlsman, M., Lachman, O., Gaba, V., Wang, Y., Shibolet, Y. M., Yang, J., Zelcer, A. (2005). Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of Cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection. *Transgenic Research*, 14, 81–93.

17. Ganesan, M., Jayabalan, N. (2006) Isolation of disease-tolerant cotton [*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2] plants by screening somatic embryos with fungal culture filtrate. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 87, 273–284.

18. Gisbert, C., Picy, B., Nuez, F. (2010-2011) Regeneration in selected *Cucurbita* spp. germplasm. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 33/34, 53–54.

19. Bajaj, Y. P. S. and ed. (2013). *High-Tech and Micropropagation V [Biotechnology in Agriculture and Forestry]*. Springer Science & Business Media, 396.

20. Kaepler, S. M., Kaepler, H. F., Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43, 179–188.

21. Kim, K.-M., Kim, Ch., K., Han, J.-S. (2010). In vitro regeneration from cotyledon explants in figleaf gourd [*Cucurbita ficifolia* Boucher], a rootstock for Cucurbitaceae. *Plant Biotechnol Rep*, 4, 101–107.

22. Krug, M., G., Z., Stipp, L. C. L., Rodriguez, A. P. M., Mendes, B. M. J. (2005). In vitro organogenesis in watermelon cotyledons. *Pesq. agropec. Bras*, 40/9, 861–865.

23. Kyung-Min, K., K. Chang, Kil, Jeung-Sul, H. (2010). In vitro regeneration from cotyledon explants in figleaf gourd [*Cucurbita ficifolia* Bouche'], a rootstock for Cucurbitaceae. *Plant Biotechnology Reports*, 4, 101–107.

24. Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B. G., Bauer, W. D. (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum sensing signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 1444–1449.

25. Miller, M. B., Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*, 55, 165–99.

26. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.

27. Ortiz-Castro, R., Martinez-Trujillo, M., Lopez-Bucio, J. (2008). N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 31, 1497–1509.
28. Park, S. M., Lee, J. S., Jegal, S., Jeon, B. Y., Jung, M., Park, Y. S., Han, S. L., Shin, Y. S., Her, N. H., Lee, J. H., Lee, M. Y., Ryu, K. H., Yang, S. G., Harn, Ch. H. (2005). Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV [Cucumber green mottle mosaic virus] infection. *Plant Cell Rep*, 24, 350–356.
29. Pérez-Clemente, R., Gómez-Cadenas, A. (2012). *In vitro* tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, 34, 92-104.
30. Rai, M., Kalia, R., Rohtas Singha, R., Gangola, M., Dhawana, A. (2011). Developing stress tolerant plants through in vitro selection [An overview of the recent progress]. *Environmental and Experimental Botany*, 71, 89–98.
31. Sakhanokho, H. F., Kelley, R. Y. (2009). Influence of salicylic acid on in vitro propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* [cv 'Luna Red']. *Afr. J. Biotechnol*, 21, 1474–148.
32. Schenk, S., Schikora, A. (2015). AHL-priming function via oxylipin and salicylic acid. *Front. Plant Sci*, 5, 784–794.
33. Schenk, S. T., Stein, E., Kogel, K.-H., Schikora, A. (2012). *Arabidopsis* growth and defense are modulated by bacterial quorum sensing molecules. *Plant Signaling & Behavior*, 7/2, 178–181.
34. Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ*, 29, 909 – 918.
35. Von Rad, U., Klein, I., Dobrev, P. I., Kottova, J., Zazimalova, E., Fekete, A., Hartmann, A., Schmitt-Kopplin, Ph., Durner, J. (2008). Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homoserinelactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta*, 229, 73–85.
36. Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1–14.

КАЛЛУСОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ СЕМЯДОЛЕЙ *CUCURBITA PEPO* VAR. *GIRAUMONTI* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ПОД ВЛИЯНИЕМ N-ГЕКСАНОИЛ-L-ГОМОСЕРИНЛАКТОНА

**О. П. Таран, Л. М. Бабенко, О. В. Мошинец, С. П. Рогальський,
О. В. Лобова, О. В. Мацкевич**

Аннотация. Регенерация эксплантов и стимуляция каллусогенеза являются актуальными задачами современной биотехнологии растений. В данной работе исследуется фитостимулирующий эффект молекулы класса ацилгомосеринлактонов (АГЛ), распространенного класса бактериальных сигнальных молекул, которые задействованы в дистанционной трансдукции сигналов между бактериями-колонизаторами фитосферы и непосредственно между бактериями и растением. Целью работы было оценить эффект обработки короткоцепочечным АГЛ – N-гексаноил-L-гомосеринлактоном [ГГЛ] эксплантов семядолей кабачка *Cucurbita pepo* var. *giraumonti* на калусогенез в условиях *in vitro*. Обработку раствором ГГЛ и ДМСО (растворитель) проводили в асептических условиях, погружая экспланты

в растворы веществ на 30 мин. Экспланты семядолей растений, которые культивировались *in vitro*, высаживали на агаризованную питательную среду для калусогенеза и культивировали при отсутствии света при температуре 25 °C. В эксперименте все экспланты формировали рыхлый каллус кремового цвета. У эксплантов, обработанных ГГЛ, установлено значительное увеличение сырой и сухой массы каллуса. Пролиферация каллуса в варианте с применением ГГЛ начиналась на несколько дней раньше, чем в контрольном варианте. Учитывая положительный эффект применения ГГЛ на пролиферацию и рост каллусной культуры на первом этапе калусогенеза уэксплантов кабачка, перспективными являются дальнейшие исследования стимулирующих эффектов ГГЛ, в частности, для оптимизации протоколов культуры растений *in vitro* и создание эффективных систем регенерации.

Ключевые слова: *Cucurbita pepo var. giraumonti*, каллусогенез, N-гексаноил-L-гомосеринлактон, АГЛ, фитостимуляторы, каллус, культура растений *in vitro*

CALLUSOGENESIS OF THE EXPLANTS *CUCURBITA PEPO* VAR. *GIRAUMONTI* IN CULTURE *IN VITRO* UNDER THE INFLUENCE OF N-HEXANOYL-L-GOMOSERINLAKTON

O. P. Taran, L. M. Babenko, O. V. Moshynets, S. P. Rogalsky,
O. V. Lobova, O. V. Matskevich

Abstract. Regeneration of the explants and stimulation of calusogenesis are topical tasks of modern biotechnology of plants. In this paper, the phyto-stimulating effect of the molecule of the class of acylgomoserinlactones (AGL), a common class of bacterial signaling molecules, which is involved in the remote transduction of signals between phytosphere bacterial colonizers and directly between bacteria and plant, is investigated. The aim of the work was to evaluate the effect of treatment of short-chain AGL – N-hexanoyl-L-homoserinlactone (HGL) the explants of the cotyledons of squash *Cucurbita pepo var. giraumonti* on callusogenesis *in vitro*. Treatment with the solution of HGL and DMSO (solvent) was carried out under aseptic conditions, immersing explants in solutions of substances for 30 minutes. Indeterminate cotyledonous plants that were cultivated *in vitro*, were planted for medium with aga-agar for callusogenesis and cultured without the light at 25 °C. In the experiment, all explants formed a loose callus of cream color. In explants, treated with HGL, a significant increase in the raw and dry weight of callus was established. The callus proliferation in the variant with AGL was started several days earlier than in the control variant. Taking into account the positive effect of the use of HGL on proliferation and the growth of callus culture in the first stage of callusogenesis of the explants squash, further research on the stimulating effects of HGL is promising, in particular, to optimize plant growth protocols *in vitro* and to create effective regeneration systems.

Keywords: *Cucurbita pepo var. giraumonti*, callusogenesis, N-hexanoyl-L-homoserinlactone, AGL, phytostimulants, callus, plant culture

in vitro