



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 55431

(13) C2

(51) 7

C07C59/70, C07D333/48, C07D211/94, A01N
39/04, A01N43/10, A01N43/40МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОЛУКИ, ЩО МАЮТЬ АУКСИНОВУ ДІЮ, І СПОСІБ ЇХ СИНТЕЗУ

1

2

(21) 99063362

(22) 16 06 1999

(24) 15 04 2003

(62) 98105267, 06 10 1998

(46) 15 04 2003, Бюл. № 4, 2003 р.

(72) Дупльнев Петро Георгійович, Кондратенко
Сергій Іванович, Чернишенко Тетяна Володи-
мирівна, Сидоров Володимир Анатолійович

(73) Дупльнев Петро Георгійович

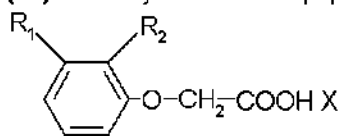
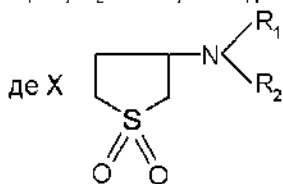
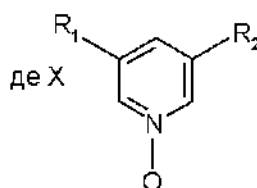
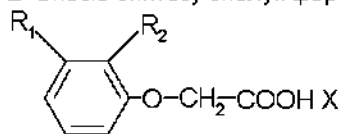
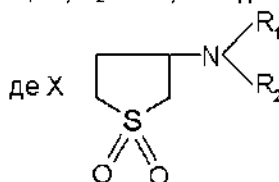
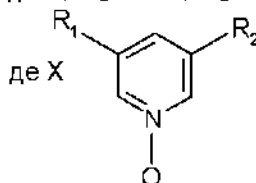
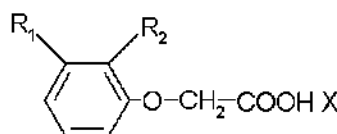
(56) UA, C1, 10 342, 25 12 1998, кл. C07D 495/00

RU, C1, 2041222, 09 08 1995, кл. C07D 319/18

RU, C1, 2047612, 10 11 1995, кл. C07D 317/58

Мельников Н.Н. Пестициды. Химия, технология и
применение - М. Химия, 1987 - С. 222-238Уоринг Ф., Филлипс И. Рост растений и диффе-
ренцировка - М. Мир, 1984 - С. 117-123, 220-228

(57) 1. Сполуки загальної формули (I)

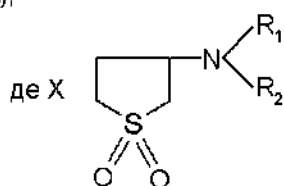
де R₁=R₂=H, алкіл, галоїд або
R₁=H, R₂=алкіл, галоїд таде R₁=R₂ або R₁=R₂=H, алкіл (C₁-C₆) абоде R₁=R₂=H, алкіл (C₁-C₄),
R₁=H, R₂=алкіл (C₁-C₄), що мають ауксинову дію
2. Спосіб синтезу сполук формули (I)де R₁=R₂=H, алкіл, галоїд або
R₁=H, R₂=алкіл, галоїд таде R₁=R₂ або R₁=R₂=H, алкіл (C₁-C₆) абоде R₁=R₂=H, алкіл (C₁-C₄),
R₁=H, R₂=алкіл (C₁-C₄)
базуються на реакції взаємодії феноксицтових
кислот з 3-аміно(алкіламіно)сульфопанамі або N-
окисом піридину, N-окисом алкілпіридинівВинахід належить до виробництва і застосу-
вання похідних феноксицтових кислот загальної
формулиR₁ = R₂ = H, алкіл, галоїд, або R₂ = H
де R₁ = H, алкіл, галоїд (у α, β, γ і ін. положен-

(13) C2

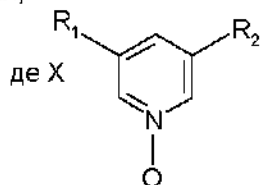
(11) 55431

(19) UA

нях),



де $R_1 = R_2$, або $R_1 \neq R_2 = H$, алкิล ($C_1 - C_6$), арил,



$R_1 = R_2 = H$, алкил ($C_1 - C_4$)

де $R = H$, алкил ($C_1 - C_4$) у 2, 3, 4 або 2, 6 положеннях

Ці сполуки мають ауксинову дію і тому можливе їх застосування у біотехнології та інших галузях народного господарства

Синтезовані нами нові похідні феноксицетових кислот, які ми пропонуємо в літературних джерелах не зустрічаються. Найближчими аналогами по дії є

1) 2,4-дихлорфеноксицетова кислота (еталон-1) або її похідні солі, які рекомендовані для використання у сільському господарстві як гербіциди [1] або в біотехнології [2] як стимулятори росту,

2) феноксицетова кислота (еталон-2), яка рекомендована як препарат, що мав ауксинову активність для використання у поживних середовищах у біотехнології рослин [3]

Головними недоліками еталону-1 є

- можливість утворення у процесі синтезу надто токсичних супровідних речовин, які суттєво забруднюють навколишнє середовище і шкідливі для здоров'я людини,

- використання еталону-1 у біотехнологічних дослідах має значні обмеження у зв'язку з гербіцидним впливом на регенераційні процеси, особливо у дводольних видів рослин і потребує додаткових трудоемких засобів по вилученню цього препарату зі складу поживних середовищ при вирощуванні *in vitro* [4]

Еталон-2 на відміну від запропонованих сполук виявив значно меншу ефективність, як стимулятор ауксинової дії (Табл 2, Табл 4) при проведенні біотестів на відібраних рослинних об'єктах

Завданням цього винаходу є пошук нових сполук, що мають більш високу ауксинову активність на відміну від еталонних препаратів для використання в біотехнології та інших галузях народного господарства. Вирішення цього завдання стає можливим за рахунок синтезу нових похідних феноксицетових кислот, а також проведення дослідів по вивченню їхньої ауксинової дії. Запропоновані сполуки стійкі при зберіженні, добре розчиняються у воді, не гігроскопічні і вибухобезпечні

Структура запропонованих сполук підтверджена елементним аналізом і ІЧ спектрами знятими на спектрофотометрі SPECORD M 80

Присутність смуг поглинання у спектрах запропонованих сполук при 1240cm^{-1} ($\nu_{\text{Ar-O-C}}$), 1580cm^{-1}

($\nu_{\text{as COO}}$), 1320cm^{-1} ($\nu_{\text{as SO}_2}$), 1040cm^{-1} (ν_{CN}) для солі 3-аміносульфолану і 4-метилфеноксицетової кислоти, 1245cm^{-1} ($\nu_{\text{Ar-O-C}}$), 1610cm^{-1} ($\nu_{\text{as COO}}$), 1310cm^{-1} ($\nu_{\text{as SO}_2}$), 1055cm^{-1} (ν_{CN}) для солі 3-метиламіносульфолану і 4-метилфеноксицетової кислоти, 1235cm^{-1} ($\nu_{\text{Ar-O-C}}$), 1580cm^{-1} ($\nu_{\text{as COO}}$), 1320cm^{-1} ($\nu_{\text{as SO}_2}$), 1060cm^{-1} (ν_{CN}) для солі 3-метиламіносульфолану і феноксицетової кислоти, 1245cm^{-1} ($\nu_{\text{Ar-O-C}}$), 1625cm^{-1} ($\nu_{\text{as COO}}$), 1185cm^{-1} ($\nu_{\text{N-OH}}$) для солі N-окису 2,6-диметилпіридину і 4-метилфеноксицетової кислоти, 1237cm^{-1} ($\nu_{\text{Ar-O-C}}$), 1610cm^{-1} ($\nu_{\text{as COO}}$), 1318cm^{-1} ($\nu_{\text{as SO}_2}$), 1065cm^{-1} (ν_{CN}) для солі 3-метиламіносульфолану і феноксицетової кислоти, 1235cm^{-1} ($\nu_{\text{Ar-O-C}}$), 1625cm^{-1} ($\nu_{\text{as COO}}$), 1320cm^{-1} ($\nu_{\text{as SO}_2}$), 1060cm^{-1} (ν_{CN}) для солі 3-метиламіносульфолану і 4-хлорфеноксицетової кислоти, 1230cm^{-1} ($\nu_{\text{Ar-O-C}}$), 1615cm^{-1} ($\nu_{\text{as COO}}$), 1315cm^{-1} ($\nu_{\text{as SO}_2}$), 1068cm^{-1} (ν_{CN}) для солі 3-аміносульфолану і 2-метилфеноксицетової кислоти, що засвідчує на користь запропонованих структур

Для кращого розуміння винаходу наводимо конкретні приклади

Приклад 1

Спосіб отримання солі 3-аміносульфолану і 4-метилфеноксицетової кислоти

У трьохгорлому реакторі, оснащеному крапельною лійкою, мішалкою і зворотнім холодильником, розчиняють $83,05\text{g}$ ($0,5\text{M}$) 4-метилфеноксицетової кислоти у 250ml ацетону і при ретельному перемішуванні до неї додають з крапельної лійки розчин $67,59\text{g}$ ($0,5\text{M}$) 3-аміносульфолану у 100ml етанолу. Реакційну масу нагрівають до кипіння і витримують 30хв . Розчинники упаровують, залишок сіль 3-аміносульфолану і 4-метилфеноксицетової кислоти $147,6\text{g}$ (98%) кристалізують з метанолу. Температура плавлення солі 3-аміносульфолану і 4-метилфеноксицетової кислоти $184 - 185^\circ\text{C}$. Знайдено, % C - $52,0$, H - $6,1$, N - $4,5$, S - $10,5$, $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_7\text{S}$. Підраховано, % C - $51,82$, H - $6,35$, N - $4,64$, S - $10,64$

Приклад 2

Спосіб отримання солі N-окису 2,6-диметилпіридину і 4-метилфеноксицетової кислоти

У трьохгорлому реакторі, оснащеному крапельною лійкою, мішалкою і зворотнім холодильником, розчиняють $33,4\text{g}$ ($0,2\text{M}$) 4-метилфеноксицетової кислоти у 150ml ацетону і потім до неї додають, при ретельному перемішуванні, в крапельної лійки розчин $27,8\text{g}$ ($0,2\text{M}$) N-окису 2,6-диметилпіридину у 50ml ацетону. Реакційну масу нагрівають до кипіння і витримують 45хв . Розчинники упаровують, залишок сіль N-окису 2,6-диметилпіридину і 4-метилфеноксицетової кислоти $49,4\text{g}$ (70%) кристалізують з метанолу. Температура плавлення солі N-окису 2,6-диметилпіридину і 4-метилфеноксицетової кислоти $56 - 58^\circ\text{C}$. Знайдено, % C - $66,6$, H - $6,4$, N - $4,7$, $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_4$. Підраховано, % C - $66,42$, H - $6,62$, N - $4,84$

Приклад 3

Спосіб отримання солі 3-метиламіносульфолану і 4-хлорфеноксицетової кислоти

В умовах попереднього дослід (приклад 1) 93,3г (0,5М) 4-хлорфеноксицтової кислоти і 74,6г (0,05М) 3-метиламіносальфолану отримують 162,8г (97%) солі 3-метиламіносальфолану і 4-хлорфеноксицтової кислоти. Температура плавлення 161 - 163°C (з метанолу). Знайдено, % C - 46,6, H - 5,6, N - 4,3, S - 9,7, Cl - 10,7, $C_{13}H_{18}NO_5S$. Підраховано, % C - 46,49, H - 5,4, N - 4,17, S - 9,54, Cl - 10,55.

Приклад 4

Спосіб отримання солі 3-аміносальфолану і феноксицтової кислоти

У трьохгорлому реакторі, оснащеному крапельною лійкою, мішалкою і зворотнім холодильником, розчиняють 76,07г (0,5М) феноксицтової кислоти у 200мл метанолу і до неї додають, при ретельному перемішуванні, з крапельної лійки розчин 67,6г (0,5М) 3-аміносальфолану у 50мл метанолу. Реакційну масу нагрівають до кипіння і витримують 45хв. Розчинник упаровують, залишок 140,8г (90%) солі 3-аміносальфолану і феноксицтової кислоти кристалізують з метанолу. Температура плавлення солі 163 - 164°C. Знайдено, % C - 50,3, H - 6,1, N - 4,9, S - 11,5, $C_{12}H_{17}NO_5S$.

Підраховано, % C - 50,16, H - 5,96, N - 4,07, S - 11,6.

Приклад 5

Спосіб отримання солі 3-метиламіносальфолану і феноксицтової кислоти

В умовах попереднього дослід (приклад 4) з 76,07г (0,5М) феноксицтової кислоти і 74,6г (0,5М) 3-метиламіносальфолану отримують 146,15г (97%) солі 3-метиламіносальфолану і феноксицтової кислоти. Температура плавлення 135 - 137°C (в метанолу).

Знайдено, % C - 51,7, H - 6,2, N - 4,7, S - 10,7, $C_{13}H_{19}NO_5S$.

Підраховано, % C - 51,82, H - 6,35, N - 4,64, S - 10,64.

Приклад 6

Спосіб отримання солі 3-аміносальфолану і 2-метилфеноксицтової кислоти і 67,6г (0,5М) 3-аміносальфолану отримують 144,5г (96%) солі 3-аміносальфолану і 2-метилфеноксицтової кислоти. Температура плавлення 155 - 157°C (в метанолу).

Знайдено, % C - 51,2, H - 6,5, N - 4,3, S - 10,2, $C_{13}H_{19}NO_5S$.

Підраховано, % C - 51,82, H - 6,35, N - 4,64, S - 10,64.

Приклад 7

Тестування препаратів на біологічну активність

Приготування рослинного матеріалу і методики проведення дослід (біотестів)

Ауксинова дія препаратів вивчалася у культурах тканини і клітин вищих рослин *in vitro* у зв'язку з дослідженнями морфогенетичних потенцій цих двох типів культур, як біологічних систем здатних до регенерації рослин. Одна (перша) біологічна система пов'язана з використанням меристематичних тканин культури експлантів гіпокотилів, інша (друга) система пов'язана з використанням соматичних клітин культури протопластів мезофіла листків. Обидві біологічні системи дозволяють стадійно простежити процес детермінації стебл-

вого морфогенезу і послідовно реалізацію програми розвитку у сформованих *de novo* рослин регенерантів.

Як відомо, згідно запропонованих принципів гормональної регуляції у культурах тканини і клітин *in vitro* [5], будь який морфогенетичний процес контролюється концентраційними співвідношеннями екзогенних фітогормонів ауксинів і цитокинінів у поживному середовищі. У зв'язку з чим ауксином відводиться регуляторна роль у процесах елонгації і поділу клітин [6]. Елонгація клітин є надзвичайно швидкою реакцією рослин на обробку ауксинами і вже починається через 10 - 15хв [6]. Окрім швидкої реакції існують більш тривалі за часом, які настають після латентного періоду протягом від декілька годин до декілька днів. Довготривалою реакцією є клітинний поділ, диференціювання і морфогенез [6]. Згідно мети проведених досліджень, при тестуванні та статистичному аналізі результатів біотестів нами враховувались тільки довготривалі морфологічні наслідки впливу проаналізованих препаратів відповідно з існуючими критеріями оцінки, які застосовуються відносно до ауксинів [6].

Як об'єкти дослідження нами було відібрано чотири сорти капусти білоголової, які відрізняються різними морфогенетичними властивостями у культурі *in vitro*, а також строками вегетації у польових умовах. Зокрема, три сорти пізньостиглої капусти: Харківська зимова, Українська осінь і Ярославна селекції Інституту овочівництва і баштанництва УААН та один сорт ранньостиглої капусти Дітмаршер Фрюер (Dithmarscher Fruher) селекції фірми "Nunhems zaden" (Голандія).

Спосіб статистичного оброблення результатів, приготування рослинного матеріалу та гормональних поживних середовищ при проведенні біотестів у культурі експлантів гіпокотилів.

Застосування у біотестах гіпокотилів капусти обумовлено тим, що цей вид рослинної тканини вміщує у своїй структурі клітини латеральної меристеми, з якої під впливом як природного (зеатин), так і синтетичних екзогенних цитокинінів (БАП, кінетин та ін.) формуються адвентивні пагони при культивуванні в асептичних умовах. Тому у якості контролю використовувалось поживне середовище, що вміщувало 1мг/л БАЛ для індукції адвентивних пагонів. Дослідні поживні середовища відрізнялися від контрольного тим, що мали у своєму гормональному складі 1мг/л БАП та додатковий вміст аналізованих препаратів ауксинової дії у рівних концентраціях.

Для приготування асептичної культури експлантів гіпокотилів насіння вищевказаних сортів капусти спочатку поверхнево стерилізували послідовним зануренням у 70% розчин етанолу (1хв), а потім у розчин гіпохлориду кальцію в концентрації 30г/л активного хлору (10хв), що вміщував 0,1% Tween-20. Далі насіння тричі відмивали у стерильній дистильованій воді протягом 10 - 20хв та висаджували на безгормональному поживному середовищі МС [7] і розміщували у темряві для пророщування при 25°C. Протягом 7 - 9 днів культивування насіння проростало і формувало стерильні рослини з надмірно подовженими етіолованими гіпокотиліями. Потім гіпокотилі з пророщеної

розсади розрізали на сегменти довжиною 5 - 7 мм і висаджували на агаризоване поживне середовище МС, доповнене аналізованими препаратами ауксинової дії у різних концентраціях. Для одного варіанту досліду 15 експлантів гіпокотилів одного сорту капусти розміщували на одну чашку Петрі з поживним середовищем.

Культивування експлантів проводили в умовах 16-годинного фотоперіоду на розсіяному світлі з низькою інтенсивністю (500люкс) і при постійній температурі повітря 25°C.

Фенологічні спостереження за розвитком культури проводились щодобово, а підрахунок кількості сформованих адвентивних пагонів після 2-х місяців культивування.

Для приготування гормональних поживних середовищ використовували заздалегідь приготовлені концентровані вихідні розчини аналізованих препаратів. Усі речовини розчиняли в універсальному розчиннику ДМСО (диметилсульфоксид) з розрахунку 1мг речовини на 1мл розчинника. Додавання речовин у поживні середовища проводили в асептичних умовах після автоклавування і охолодження останніх до 40 - 50°C.

Для вивчення стимуляторної дії кожен аналізований препарат випробували у 4-х концентраціях 0,25, 0,5, 1 та 3мг/л відповідно. За еталонні ауксини було прийнято фенольні стимулятори 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота) і ФОК (феноксиоцтова кислота).

Під час проведення тестових аналізів враховувався статистичний показник формування вегетативного потомства коефіцієнт розмноження (КР) - кількість утворених адвентивних пагонів на один культивований експлант гіпокотилів. Для підрахунку КР використовували статистичний спосіб оцінки результатів досліджень, який враховував дискретне варіювання цієї контрольованої ознаки [9]. Для однієї аналізованої сполуки дослід проводили у трьократній повторності.

Спосіб статистичного обрахунку результатів, приготування рослинного матеріалу та гормональних поживних середовищ при проведенні біотестів у культурі мезофільних протопластів.

Для біотестів у культурі мезофільних протопластів використовували рослини сорту Джітмаршер Фрюер, які вирощували в умовах *in vitro*.

Для отримання мезофільних протопластів використовували листя 3-4 тижневих рослин. Тканину листа розрізали на смуги 1мм завширшки та інкубували у ферментному розчині, що вміщував 0,5% Macerozyme ("Calbiochem", США), 0,5% Onozuka R-10 ("Jacult Biochemicals", Японія), 0,5М сахарози та 5мМ CaCl₂ (рН 5,6) в темряві при 28°C протягом 16 - 18 год. Ізольовані протопласти відокремлювали від залишків тканини шляхом фільтрування через металеві фільтри з діаметром пор 64мкм. Фільтрат переносили в центрифужні пробірки на 10мл та центрифугували зі швидкістю 700 обертів/хв протягом 7хв. Кільце флотованих протопластів відбирали пастерівською піпеткою та відмивали не менше двох разів в середовищі W5 (Medgyesy et al. 1980), осаджуючи їх кожного разу центрифугуванням протягом 5хв при 700 обертів/хв. Після цього відбирали надосадочну рідину та культивували протопласти в рідкому поживному

середовищі з попередньою фіксацією в алгінатній плівці відповідно Damm and Willmitzer (1988). Для цього до протопластів додавали 0,5М мантолу так, щоб концентрація протопластів складала 80 x 10⁴ клітин/мл. Суспензію протопластів змішували з однаковим об'ємом 2,8%-ного розчину алгінату натрію в 0,4М мантолі. У подальшому 1мл суміші переносили в чашки Петрі діаметром 50мм з агаризованим середовищем, яке вміщувало 20мМ CaCl₂ в 0,4М мантолі та розподіляли по поверхні середовища так, щоб внаслідок присутності іонів Ca²⁺ утворилась тонка алгінатна плівка з іммобілізованими в ній протопластами. Після процедури фіксації в алгінатній плівці культури переносили на рідке поживне середовище ТМ_{мод3} (Табл 1), що вміщувало препарати ауксинової та цитокінінової дії для стимуляції цитокінезу клітин. Для подальшого формування калусної культури, утворенні мікроколонії клітин на стадії 3-го та 4-го мітотичних циклів переносили на рідке середовище ТМ_{мод3} (Табл 1) для дорощування. Середовище ТМ_{мод3} повністю поновлювали кожні 10 днів і використовували до утворення колоній діаметром 0,5 - 1,5мм. Після чого алгінатну плівку розчиняли за допомогою 0,3М розчину цитрату натрію в 0,4М мантолі. Потім колонії клітин переносили на агаризоване регенераційне середовище ТМ_{мод4} (Табл 1) і вирощували при 25°C на світлі інтенсивністю 5клк та фотоперіодом 16год. Калус пересаджували кожні два тижні на свіже поживне середовище ТМ_{мод4}. Рослини, що регенерували, переносили на безгормональне середовище МС для укорінення.

Протягом усього періоду культивування для визначення стимуляторної дії кожен аналізований препарат додавали у концентраціях 0,5мг/л у поживні середовища ТМ_{мод2} і ТМ_{мод3} та 0,2мг/л у ТМ_{мод4}.

Для підрахунку результатів біотестів враховували такі показники:

1) час культивування ініціальних клітин до фази 1-го мітотичного циклу (в добах) на середовищі ТМ_{мод2},

2) ефективність висіву протопластів (ЕВП) оцінювали у відсотках як співвідношення кількості калусних колоній, що сформувалися на середовищі ТМ_{мод3} до загальної кількості протопластів,

3) частоту регенерації (ЧР) визначали у відсотках як співвідношення кількості калусних колоній, здатних до морфогенезу на середовищі ТМ_{мод4} до загальної кількості отриманих колоній на середовищі ТМ_{мод3}.

При проведенні біотестів до складу поживних середовищ ТМ_{мод2} і ТМ_{мод3} було введено нафтилоцтову кислоту (НОК), як препарат ауксинової дії, додавання якого у експериментально підібраному співвідношенні з еталонними фенольними ауксинами індукувало одночасні елонгацію і цитокінез клітин (Табл 3), що є необхідною передумовою росту мікроколоній клітин. При чому, як свідчать результати попередніх дослідів використання тільки однієї НОК разом з цитокініном БАП викликає тільки елонгацію клітин без ініціації клітинного поділу протопластів (Табл 3). Тому тестування аналізованих препаратів проводилось з метою порівняльного аналізу з дією еталонних фенольних

ауксинів на індукцію цитокинезу клітин у такому ж поєднанні в НОК. Для однієї аналізованої сполуки дослід проводили у трьократній повторності.

Використані у біотестах БАП (бензиламінопурин), зеатин, НОК, 2,4-Д та ФОК виробництва компанії "Sigma" (США).

Порівняльний аналіз еталонних і запропонованих препаратів на ауксинову дію у культурах експлантів пілокотилів і мезофільних протопластів.

Як свідчать результати досліджень на двох типах культур усі аналізовані препарати виявили притаманну ауксином регуляторну дію, яка за своїм характером більше відповідає довготривалим фізіологічним реакціям рослинних об'єктів на обробку екзогенними ауксинами. Зокрема, у культурі мезофільних протопластів (Табл. 4) запропоновані сполуки виявили адекватну дію еталонним препаратам по:

1) ініціації 1-го мітотичного циклу клітин на поживному середовищі ТМ_{мод2},

2) індукції фізіологічнорівнополярного поділу клітин у сформованих калусних клонів на поживному середовищі ТМ_{мод3},

3) стимуляції цитокинезу клітин при подальшому нарощуванні калусних клонів до критичної маси, необхідної для пересіву на регенераційне поживне середовище ТМ_{мод4}.

Додатково слід зауважити, що при вищезазначених стимуляторних діях застосування препаратів на регенераційному середовищі ТМ_{мод4} не виявило гербіцидного впливу на проліферацію адвентивних пагонів на відміну від еталонного препарату 2,4-Д у випробуваній концентрації 0,2 мг/л. Відзначимо, також, значно кращі значення часу ініціації 1-го мітотичного циклу клітин, ЕВП та ЧР при застосуванні більшості аналізованих препаратів на відміну від еталонних (Табл. 4). Як показали попередні досліді на двох типах культур застосовані препарати ауксинової дії, що є похідними нафтолу (це нафтилоцтова або індолилцтова кислоти (ІОК)) виявляють найбільший вплив на детермінацію меристематичних клітин корінців на відміну від досліджених фенольних сполук та похідних піридину. Тому присутність

НОК або ІОК у гормональному складі регенераційного поживного середовища для культури протопластів у випробуваній концентрації 0,2 мг/л завжди стимулювало укорінення калусної тканини і знижувало її морфогенетичний потенціал ще до утворення пагонів. Культивування експлантів пілокотилів у присутності 0,2 мг/л НОК або ІОК стимулювало одночасний розвиток пагонів та корінців тільки на відповідних фізіологічних полках експлантів. При такій одночасній стимуляції ризогенезу у присутності вищезазначених ауксинів значно знижувалась кількість утворених адвентивних пагонів на двох типах культур (дані не наведені) і інколи навіть спонукало спонтанне повернення тканин до дедиференціального росту у культурі калусної тканини на середовищі ТМ_{мод4} на відміну від аналізованих нами препаратів іншого синтетичного походження.

Морфогенетичні наслідки впливу аналізованих препаратів у культурі експлантів пілокотилів наведені у Таблиці 2. Як свідчать ці результати, додавання препаратів у концентраціях від 0,25 до 0,5 мг/л, а інколи і до 1 мг/л загалом підвищувало кількість утворених адвентивних пагонів у порівнянні з контролем (поживним середовищем, що вміщувало тільки екзогенний цитокінін) у декілька разів. При цьому спостерігалась тенденція до пропорційного зростання показника КР відповідно вмісту аналізованої сполуки. Але при випробуванні високих концентрацій препаратів від 1 до 3 мг/л (для деяких препаратів тільки 3 мг/л) відбувалося зниження регенераційних властивостей меристематичних тканин, інколи до її повної відсутності при тестуванні окремих сполук. Застосування еталонного препарату 2,4-Д виявило гербіцидний вплив цієї сполуки на регенерацію пагонів на всіх досліджених концентраціях. Слід відзначити, що збільшення концентрації цитокініна БАП більше, ніж 1 мг/л не призводить до вrostання показника КР, а навпаки пригнічує регенерацію рослин. У попередніх дослідіах по визначенню оптимального вмісту цитокініну було обрано контрольний варіант поживного середовища для біотестів саме з такою концентрацією БАП.

Таблиця 1

Поживні середовища для культивування протопласта та регенерації рослин білоголової капусти

Компоненти, мг/л*	ТМ _{мод2}	ТМ _{мод3}	ТМ _{мод4}
Мікроелементи			
NH ₄ NO ₃	200	200	200
KNO ₃	1500	1500	1500
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	440	440
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170
Fe-хелат			
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3

Продовження таблиці 1

Компоненти, мг/л*	ТМ _{мод2}	ТМ _{мод3}	ТМ _{мод4}
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
Мікроелементи			

H ₃ BO ₃	3,0	3,0	3,0
MnSO ₄ x 4H ₂ O	13,2	13,2	13,2
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2,0	2,0	2,0
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
KJ	0,75	0,75	0,75
CoSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Вітаміни та ін. біологічно активні речовини			
мезоінозит	100	100	100
гліцин	2	2	2
B ₁	10	10	10
B ₆	1	1	1
РР	1	1	1
гідролізат казеїну	150	500	500
глютамін		500	500
ксилоза	125	250	
Гормони			
НОК (нафтилоцтова кислота)	1,0	0,1	
АС**	0,5	0,5	0,2
БАП (бензил-амінопурін)	0,5	0,5	
зеатин		0,5	1,0
Сахара			
сахароза			40000
глюкоза	90100 (0,5M)	72000 (0,4M)	27000 (0,15M)
pH	5,8	5,8	5,8

*Примітка для культивування мезофільних протопластів сорту капусти Дітмаршер Фрієр було використано модифікований варіант поживного середовища Шахіна ТМ-2 (Shahin, 1985) [8], зокрема для ініціації цитокінезу клітин – ТМ_{мод2}, для нарощування мікроколоній - ТМ_{мод3}, для регенерації рослин - ТМ_{мод4}.

**Примітка АС - аналізовані сполуки, що додавалися у середовища для культивування протопластів з метою тестування їхньої ауксинової дії

Таблиця 2

Вплив препаратів ауксинової дії на індукцію адвентивних пагонів досліджених сортів капусти у культурі експлантів гіпокотилів

Назва препарату	Концентрація препарату (мг/л)	Значення статистичного показника коефіцієнта розмноження (КР) для досліджених сортів капусти		
		Для сорту Ярославна	Для сорту Харківська зимова	для сорту Українська осінь
бензиламінопурін (контроль)	1,0	1,12 ± 0,47	1,05 ± 0,23	0,80 ± 0,56
2,4-дихлор-феноксиоцтова кислота (еталон-1)	0,25	0,0	0,0	0,0
	0,5	0,0	0,0	0,0
	1,0	0,0	0,0	0,0
	3,0	0,0	0,0	0,0
феноксиоцтова кислота (еталон-2)	0,25	3,60 ± 0,95	3,40 ± 0,79	1,60 ± 0,92
	0,5	2,40 ± 0,60	4,56 ± 0,97	1,67 ± 1,02
	1,0	0,80 ± 0,49	3,90 ± 1,19	0,20 ± 0,10
	3,0	0,0	0,50 ± 0,47	0,0
сіль 3-метиламіно-сульфолану і феноксиоцтової кислоти	0,25	4,67 ± 0,11	3,11 ± 0,84	4,25 ± 1,09
	0,5	3,25 ± 0,66	1,63 ± 0,68	3,67 ± 1,13
	1,0	3,00 ± 0,98	1,20 ± 0,47	1,00 ± 0,57
	3,0	2,30 ± 0,66	1,15 ± 0,45	0,0

Продовження таблиці 2

Назва препарату	Концентрація препарату (мг/л)	Значення статистичного показника коефіцієнта розмноження (КР) для досліджених сортів капусти		
		Для сорту Ярославна	Для сорту Харківська зимова	для сорту Українська осінь
сіль 3-аміносульфолану і феноксиоцтової кислоти	0,25	3,33±0,88	3,50±1,14	2,67±1,45
	0,5	2,70±0,70	3,83±0,77	2,80±1,31
	1,0	2,60±1,18	1,92±0,43	0,80±0,52
	3,0	1,50±0,78	1,00±0,34	0,20±0,18
сіль 3-метиламіносульфолану і 2-метилфеноксиоцтової кислоти	0,25	4,38 ± 0,68	3,50±0,79	2,00±0,85
	0,5	0,22±0,18	0,40±0,25	0,80±0,44
	1,0	0,10±0,37	0,30±0,14	0,20±0,18
	3,0	0,0	0,0	0,0
сіль 3-метиламіносульфолану і 4-метилфеноксиоцтової кислоти	0,25	2,30±0,58	3,50±0,57	1,67±0,84
	0,5	1,90±0,49	3,20±0,51	1,00±0,69
	1,0	1,20±0,53	3,17±1,01	0,60±0,36
	3,0	0,40±0,38	1,50±0,45	0,50±0,31
сіль 3-метиламіносульфолану і 4-хлорфеноксиоцтової кислоти	0,25	3,67 ± 1,67	4,00±1,47	5,33±2,94
	0,5	4,33±1,35	3,67±1,84	4,17±1,88
	1,0	7,00±1,80	1,67±0,15	0,50±0,31
	3,0	0,0	0,0	0,0
сіль N-окису 2,6-диметилпіридину і 4-метилфеноксиоцтової кислоти	0,25	5,50±2,34	0,86±0,55	0,17±0,15
	0,5	6,17±2,99	5,00±1,51	2,67±1,76
	1,0	7,17±1,54	3,33±0,81	2,17±1,04
	3,0	0,0	1,33±1,04	0,0
сіль 3-аміносульфолану і 4-метилфеноксиоцтової кислоти	0,25	2,30±1,49	1,79±0,44	3,88±0,35
	0,5	2,50±1,33	2,33±0,90	5,17±1,50
	1,0	3,29±0,97	2,73±0,61	1,49±1,77
	3,0	4,17±1,59	1,33±0,77	0,17±0,15

Таблиця 3

Вплив комбінованої дії ауксинових препаратів рівного синтетичного походження на одночасні стимуляції елонгації, цитокінезу та росту мікроколоній клітин у культурі протопластів сорту капусти Дітмаршер Фрюер (за результатами роботи з еталонними препаратами)

Досліджені комбінації гормонів поживних середовищ (мг/л)				Морфофізіологічні реакції клітин на застосованих поживних середовищах для культивування	
2,4 Д	ФОК	НОК	БАП	ТМ _{мод2}	ТМ _{мод3}
1,0		0,2	0,5	рkv	рkv
	1,0	0,2	0,5	рkv	рkv
		1,0	0,5	ел	ел
0,2		1,0	0,5	ел, цтк, рmk	ел, цтк, рmk
	0,2	1,0	0,5	ел, цтк, рmk	ел, цтк, рmk
	0,2	0,1	0,5	рkv	ел, цтк, рmk*
0,2		0,1	0,5	рkv	ел, цтк, рmk*

Умовні позначення до Таблиці 3 рkv - реакція клітин відсутня, ел - елонгація, цтк - цитокінез, рmk - ріст мікроколоній клітин

*Примітка вищезазначені морфофізіологічні реакції спостерігались після пересіву сформованих мікроколоній на середовище ТМ_{мод3} з середовища ТМ_{мод2}, що мало такі гормональні співвідношення для ініціації елонгації та цитокінезу клітин 1,0мг/л НОК, 0,5мг/л БАП, 0,2мг/л 2,4-Д або 1,0мг/л НОК, 0,5мг/л БАП, 0,2 ФОК

Таблиця 4

Вплив аналізованих та еталонних препаратів ауксинової дії на ініціацію цитокінезу та ріст мікроколоній клітин на рівних стадіях культури мезофільних протопластів сорту капусти Дітмаршер Фрюер

Назва препарату	Значення застосованих показників стану культури протопластів на рівних стадіях культивування		
	час культивування до ініціації 1-го мітотичного циклу на серед ТМ _{мод2} (у добах)	ефективність висіву протопластів на серед ТМ _{мод3} (ЕВП, %)	частота регенерації на серед ТМ _{мод4} (ЧР, %)
2,4-дихлор-феноксіоцтова кислота (еталон-1)	7 - 8	5,57 ± 0,79	0,0
феноксіоцтова кислота (еталон-2)	9 - 10	3,67 ± 0,21	15,8 ± 1,19
сіль 3-метиламіносульфолану і феноксіоцтової кислоти	3 - 4	11,36 ± 0,69	67,8 ± 1,45
сіль 3-аміносульфолану і феноксіоцтової кислоти	5 - 7	5,77 ± 0,71	47,2 ± 0,34
сіль 3-метиламіносульфолану і 2-метилфеноксіоцтової кислоти	7 - 8	3,45 ± 0,56	10,4 ± 0,23
сіль 3-метиламіносульфолану і 4-метилфеноксіоцтової кислоти	5 - 7	7,23 ± 0,18	34,4 ± 0,67
сіль 3-метиламіносульфолану і 4-хлорфеноксіоцтової кислоти	3 - 4	12,65 ± 0,89	71,3 ± 2,68
сіль N-окису 2,6-диметилпіридину і 4-метилфеноксіоцтової кислоти	5 - 8	11,74 ± 0,24	68,9 ± 1,63
сіль 3-аміносульфолану і 4-метилфеноксіоцтової кислоти	5 - 9	10,49 ± 1,27	41,3 ± 0,56

Література

- 1 Мельников Н.Н. Пестициды. М. "Химия", 1987. 229с
- 2 Dudits D., Gyorgyey J., Bogre L., Dako L. Molecular Biology of Somatic Embryogenesis. T.A. Thorpe (ed.) In Vitro Embryogenesis in Plants, P. 267 - 300. 1995. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. Printed in the Netherlands
- 3 Уоринт Ф., Филиппс И. Рост растений и дифференцировка. М. "Мир", 1984. 512с
- 4 Дрейпер Дж. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. М. "Мир", 1991. 408с

5 Skoog F., Miller W. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro, Symp. Soc. Biol. 1957, 11, P. 118

6 Theologis A. Rapid gene regulation by auxin. Rev. Plant Physiol. 1986. V. 37, P. 407 - 438

7 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. plant. 1962. V. 15, P. 473 - 497

8 Shahin E.A. Totipotency of tomato protoplast. Theor. Appl. Genet. 1985. V. 69, P. 235 - 240

9 Десяртова Н.І. Лабораторний і польовий практикум з генетики. Київ, 1973. 272с