
IV. ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 582.669.2 : 581.143.6

Колдар Л. А.

Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України

МОРФОГЕНЕЗ ЕКСПЛАНТІВ *DIANTHUS GRATIANOPOLITANUS* VILL. У КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

Наведено дані щодо морфогенезу експлантів *D. gratianopolitanus* Vill. залежно від фітогормонального складу живильних середовищ, створених для розмноження *in vitro*. Одержано експланти та рослини-регенеранти придатні для подальшого розмноження з метою збереження генофонду рослин даного виду в умовах *in vitro*, *ex vitro* та *in vivo*.

Вступ

Одним із напрямків збереження рослинного різноманіття є введення рідкісних представників світової флори в культуру, що дає змогу не тільки поглиблювати знання про їх екологічні та біологічні особливості, а й створювати вагомий банк рослинного матеріалу, який в перспективі може бути використаний для реінтродукції рослин у місця природного росту. Такі завдання було закріплено міжнародними документами, зокрема, Глобальною стратегією збереження рослин [1] та Європейською стратегією збереження рослин на 2008–2014 роки [10].

Серед природоохоронних заходів, пов'язаних з діяльністю ботанічних установ України, важливе місце належить створенню і збереженню в умовах культури колекцій рідкісних і зникаючих видів. Особливу увагу при цьому необхідно приділяти розробці методів розмноження раритетних видів

природної флори України, які базуються на основі вивчення їхньої життєздатності та перспектив збереження [9].

До видів, що знаходяться під загрозою зникнення, належить *Dianthus gratianopolitanus* Vill. (родина *Caryophyllaceae* Juss.) — гвоздика граціано-політанська, гвоздика гренобльська або гвоздика сиза. Це Субальпійський елемент у Середній Європі та на прилеглих рівнинних територіях. Вид занесений до Європейського червоного списку [2]. У другому виданні Червоної книги України (1996) наведено дані, що *D. gratianopolitanus* трапляється лише на околицях с. Хрещатик Заставнівського р-ну Чернівецької області [7]. Проте у третьому виданні цієї книги (2009) повідомляється, що неодноразові спроби віднайти вид у природі не дали результатів. Причини зміни чисельності — антропогенний вплив: скорочення відкритих площ

за рахунок заліснення схилів, вузька стенопотність виду та слабка конкурентоздатність. Тому вид має природоохоронний статус — зниклий у природі [8].

При огляді літературних джерел було встановлено, що наукові дослідження присвячені розмноженню та репатріації рослин *D. gratianopolitanus* нам невідомі, тому проведення експериментальних досліджень у даному напрямку є актуальним. Мета роботи — провести оптимізацію живильних середовищ для успішного введення експлантів *D. gratianopolitanus* у культуру *in vitro*, дослідити особливості морфогенного розвитку рослин, одержати рослини-регенеранти.

Матеріали та методи досліджень

При культивуванні рослин *in vitro* використовували метод індукції морфогенезу рослин під дією регуляторів росту. Матеріалом для досліджень слугували мікроживці з апікальними та пазушними бруньками взяті з рослин *D. gratianopolitanus* в період активного росту (20.05–20.06). Базове живильне середовище використане у дослідках — Мурасіге і Скуга (МС) [11]. Для вивільнення рослинного матеріалу від патогенної флори використовували хімічні реагенти: 2,5 % гіпохлорид натрію (NaClO), 0,1 % дихлорид ртуті (HgCl_2), 1 % нітрат срібла (AgNO_3), розчини етанолу та препарату «Биомой». Найбільший відсоток стерильних експлантів було отримано при послідовній обробці: 10 % препаратом «Биомой» (15 хв.), 70 % етанолом (30 сек.) та 0,1 % HgCl_2 (5 хв.).

Ріст і розвиток стерильних експлантів відбувався у культуральній кімнаті з регульованими умовами культивування: температура $25 \pm 1^\circ\text{C}$, фотоперіод 16 год., освітленість 3000–5000 лк, відносна вологість повітря 70 %. Живильні середовища, посуд, матеріали та інструменти готували згідно загальноприйнятих методик [3, 6]. Дослідження проведено у лабораторії мікроклонального розмноження відділу фізіології, генетики селекції та біотехнології рослин Національного дендропарку «Софіївка» НАН України.

Результати досліджень та їх обговорення

У природних умовах *D. gratianopolitanus* розмножується лише насінням та характеризується низькою конкурентною здатністю, що обмежує ареал поширення. Здійсненню інтенсифікації репродуктивного процесу, прискоренню вегетативного

розмноження та дослідженню онтогенетичного розвитку рослин може сприяти розмноження рослин в умовах культури, не завдаючи при цьому шкоди природним популяціям [9]. У культурі для розмноження рослин *D. gratianopolitanus* використовують насіннєвий та вегетативний методи. Поряд з уже існуючими, важливе місце належить методу мікроклонального розмноження рослин у культурі *in vitro*, який є одним із головних у сучасній біотехнології та базується на культивуванні рослин з використанням штучних живильних середовищ. Крім цього він є одним із методів, що забезпечує збереження генофонду рослин [4].

Відомо, що впродовж всього життя рослина зберігає частини меристемних тканин, які в результаті фітогормональної регуляції процесів росту мають властивість давати початок організованим структурам — брунькам, пагонам, кореням, ембріодам, рослинам тощо. У наших дослідках було випробувано різні концентрації фітогормонів, які відіграють основну роль у системі регуляції та інтеграції процесів росту та плину процесів морфогенезу.

У практиці мікроклонального розмноження відомо два види морфогенезу: прямий — утворення рослин-регенерантів із експлантів шляхом активації меристем та непрямий — утворення рослин-регенерантів із первинного чи субкультивованого калюсу.

Процес розмноження *D. gratianopolitanus* у культурі *in vitro* розпочинали з вивільнення рослинного матеріалу від патогенної флори за використання хімічних реагентів. Одержані стерильні експланти переносили для культивування на живильне середовище Мурасіге і Скуга (МС) модифіковане різним вмістом фітогормонів: 6-бензиламінопуріном (6-БАП), 1-нафтилоцтовою кислотою (1-НОК), 3-індолилоцтовою кислотою (3-ІОК)

У результаті вдалого підбору кількісного співвідношення концентрацій фітогормонів (табл. 1) впродовж 12–18 діб у деяких варіантах спостерігали початок морфогенного розвитку експлантів, при якому шляхом активації меристемних тканин, починали формування додаткові пагони.

На середовищі МС-1, без вмісту ауксинів, розвиток експлантів не спостерігали. На МС-2–МС-6 морфогенний розвиток був значно слабшим, ніж у варіантах МС-7–МС-12. Найбільш активно процес морфогенезу відбувався у варіанті МС-9 з додаванням 6-бензиламінопурину (6-БАП) 0,5 мг/л та 1-нафтилоцтової кислоти (1-НОК)

1. Морфогенез експлантів *D. gratianopolitanus* залежно вмісту регуляторів росту у живильних середовищах

Варіанти	Регулятори росту, мг/л			Кількість утворених пагонів, шт. (середні показники)	Коефіцієнт розмноження
	6-БАП	3-ЮК	1-НОК		
МС-1	0	0	0	0	0
МС-2	0	0,1	0	0,2	0,1
МС-3	0	0	0,1	2,1	2,6
МС-4	0,25	0	0	3,3	3,9
МС-5	0,25	0,1	0	6,1	13,9
МС-6	0,25	0	0,1	7,5	17,8
МС-7	0,5	0	0	9,7	22,3
МС-8	0,5	0,1	0	13,1	31,8
МС-9	0,5	0	0,1	14,2	54,0
МС-10	1,0	0	0	15,9	23,9
МС-11	1,0	0,1	0	18,7	29,9
МС-12	1,0	0	0,1	18,4	30,4

0,1 мг/л, у якому впродовж 18–26 діб з одного експланта було сформовано до 10–18 мікропагонів. При цьому коефіцієнт розмноження досягав 54,0. Впродовж 28–34 діб спостерігали активний прояв процесу морфогенезу, під час якого відбувалося активне формування пагонів, кількість яких становила 26–35 шт. (рис. 1).

Підвищення концентрації БАП до 1,0 мг/л (МС-10–МС-12) сприяло збільшенню кількості мікропагонів у 1,1–1,3 рази. Варто відзначити, що

постійна присутність у складі середовища підвищених концентрацій 6-БАП (1,0–2,0 мг/л) викликала утворення вітрифікованих пагонів у рослин-регенерантів, і це явище призводило до значних втрат рослинного матеріалу. Для досягнення експлантами ризогенезу, було проведено модифікацію живильних середовищ шляхом підбору різних концентрацій ауксиновмісних речовин, які додавали до середовищ. З досліджених регуляторів росту найбільш ефективною була β -індолилмасляна кислота

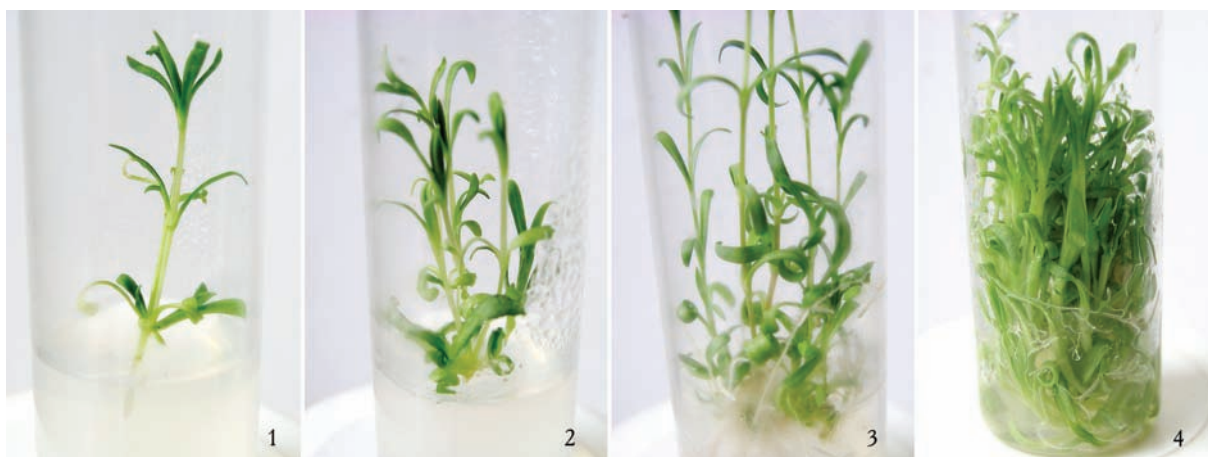


Рис. 1. Морфогенний розвиток експлантів *D. gratianopolitanus*
1— введений експлант; 2–4 — динаміка морфогенезу

(β -ІМК) у концентрації 0,5 мг/л. За такого складу живильного середовища початок ризогенезу спостерігали через 10–15 діб (рис. 2). Впродовж наступних 10–20 діб культивування, було отримано близько 90 % укорінених рослин.

Завершальним і досить відповідальним етапом при культивуванні рослин *in vitro* є адаптація до умов *ex vitro*, яка можлива лише тоді, коли рослина здатна проявити стійкість та пристосувати свою життєдіяльність до нових умов існування. На даній стадії розвитку, при перенесенні рослин-регенерантів у нестерильні умови, вони потребують ретельного догляду і регульованих умов культивування [5]. Тому виникає необхідність створити такі умови адаптації рослин до умов *ex vitro*, при яких можна отримати найвищий відсоток приживлення. Одержані рослини-регенеранти *D. gratianopolitanus* переносили до адаптаційної кімнати, висаджували у торф'яні таблетки та розміщували у спеціальні контейнери з регульованими умовами росту. Постійними підтримували температуру, вологість



Рис. 2. Ризогенез у *D. gratianopolitanus*

повітря та освітленість 3000–5000 лк. За таких умов дорощування вихід адаптованих рослин, здатних до культивування в умовах *in vivo*, становив 87 ± 2 %. Такі рослини переносили на ділянки дорощування у відкритому ґрунті. Подальше їх вирощування потребувало підтримування умов незначного зволоження та видалення бур'янів. Впродовж 30–40 діб рослини успішно проходили адаптацію, про що свідчило утворення міцної кореневої системи та активне наростання вегетативної маси.

Висновки

1. Встановлено, що морфогенний розвиток експлантів *D. gratianopolitanus* відбувався при дії різних концентрацій фітогормонів (ауксинів та цитокінінів).
2. Найбільш активний процес морфогенезу спостерігали у варіанті МС-9 з додаванням 6-бензиламінопурину (6-БАП) 0,5 мг/л та 1-нафтилоцтової кислоти (1-НОК) 0,1 мг/л у якому впродовж 18–26 діб з одного експланта було сформовано до 10–18 мікропагонів. При цьому коефіцієнт розмноження досягав 54,0.
3. З досліджених індукторів ризогенезу найбільш ефективною була β -індолилмасляна кислота (β -ІМК) у концентрації 0,5 мг/л де початок ризогенезу спостерігали через 10–15 діб, а впродовж наступних 10–20 діб культивування, було отримано близько 90 % укорінених рослин.

Перелік посилань

1. Глобальная стратегия сохранения растений. — BGCI: Rishmond, U. K., 2002. — 16 с.
2. Европейский Красный список животных и растений, находящихся под угрозой исчезновения во всемирном масштабе. — Нью-Йорк: ООН, 1992. — 167 с.
3. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. — К.: Наук. думка, 1980. — 488 с.
4. Колдар Л. А., Небиков М. В. Мікроклональне розмноження рослин *C. siliquastrum* L. // Інтродукція рослин. — К.: Академперіодика, 2007. — № 4. С. 88–92.
5. Колдар Л. А. Особливості адаптації рослин-регенерантів *Cercis siliquastrum* до умов *ex vitro* // Інтродукція рослин. — К.: Академперіодика, 2009. — № 4. — С. 65–67.
6. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.

7. Червона Книга України: Рослинний світ / За ред. Ю. Р. Шеляг-Сосонка. — К.: Українська енциклопедія ім. Бажана, 1996. — 602 с.
8. Червона Книга України. Рослинний світ / За ред. Я. П. Дідуха. — К.: Глобалконсалтинг, 2009. — 912 с.
9. Собко В. Г., Гапоненко М. Б., Гнатюк А. М., Деркач О. В., Мініна Ю. В., Решетюк О. В. Репатріація фітораритетів як активний засіб відновлення популяцій і покращення біологічного стану довкілля // Роль ботанічних садів в зеленому будівництві міст, курортних та рекреаційних зон: Матер. міжнар. наук. конф., 20–24 травня 2002 р. — Одеса: ЛАТ-СТАР, 2002. — Ч. II. — С. 138–141.
10. *A Sustainable Future for Europe; the European Strategy for Plant Conservation 2008–2014* / Developed by the Planta Europe and Council of Europe. — Salisbury, UK — Strasbourg, France, 2008. — 63 p.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — Vol. 15. — № 13. — P. 473–497.

МОРФОГЕНЕЗ ЕКСПЛАНТОВ *DIANTHUS GRATIANOPOLITANUS* VILL. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Колдар Л. А.

Национальный дендрологический парк «Софиевка» НАН
Украины

Исследовали зависимость морфогенеза эксплантов *Dianthus gratianopolitanus* Vill. от фитогормонального состава питательных сред. Наиболее активно процесс морфогенеза происходил в варианте МС–9, где за 18–26 дней было сформировано 10–18 микропобегов, а коэффициент размножения составлял 54.

MORPHOGENESIS OF *DIANTHUS* *GRATIANOPOLITANUS* VILL. EXPLANTS CULTURED *IN VITRO*

Koldar L. A.

National dendrological park «Sofiyvka» of the NAS of Ukraine

The dependence of *Dianthus gratianopolitanus* Vill. explants morphogenesis on phytohormonal composition of nutrient medium was study. The morphogeny process progressed the most actively in the МС–9 variant where in 18–26 days 10–18 microsprouts were formed and multiplication constant made up to 54.