

РИЗОГЕНЕЗ ЕКСПЛАНТІВ *SILENE HYPANICA* KLOKOV ТА ЇХ АДАПТАЦІЯ ДО УМОВ *EX VITRO*

Серед природоохоронних заходів, пов'язаних зі збереженням рослинного різноманіття, важливе місце належить створенню і збереженню в умовах культури рідкісних видів і видів, що зникають. Так, під загрозою зникнення перебуває вид *Silene hypanica* Klokov, реліктовий, ендемічний вид, занесений до Червоної книги України, Європейського червоного списку, Резолюції 6 Бернської конвенції. Перспективи збереження пов'язані з вивченням його життєздатності та потребують розроблення ефективних методів розмноження, зокрема в культурі *in vitro*. У статті наведено результати досліджень одного з етапів розмноження *in vitro* – ризогенезу експлантів *S. hypanica* та його залежність від концентрацій у живильних середовищах β -індолілмасляної кислоти (β -ІМК) (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мг/л) з подальшою адаптацією вкорінених рослин *in vitro* до умов *ex vitro*. З'ясовано, що активний процес ризогенезу відбувався за додавання до живильного середовища β -ІМК у концентрації 0,5 мг/л і сприяв одержанню 86,4% укорінених *in vitro* рослин-регенерантів. Пересаджування їх у торф'яні диски з подальшим дорошуванням у контейнерах сприяло успішній адаптації укорінених рослин.

Ключові слова: *Silene hypanica* Klokov, мікроклональне розмноження, β -індолілмасляна кислота, концентрації, рослини-регенеранти, укорінення, адаптація, субстрат.

Одним із напрямків збереження рослинного різноманіття є введення в культуру рідкісних видів світової флори і видів, які зникають, що дає змогу не лише поглиблювати знання про їх екологічні та біологічні особливості, а й створювати вагомий банк рослинного матеріалу, який у перспективі може бути використаний для реінтродукції рослин у місця їх природного росту. Серед природоохоронних заходів, пов'язаних з діяльністю ботанічних установ України, важливе місце належить створенню й збереженню в умовах культури колекцій рідкісних видів і видів, що зникають. Велике значення при цьому має розробка ефективних методів розмноження раритетних видів природної флори на основі вивчення їхньої життєздатності та перспектив збереження [9].

До видів, що перебувають під загрозою зникнення, належить *Silene hypanica* Klokov (родина *Caryophyllaceae* Juss.) – реліктовий, ендемічний вид, занесений до Червоної книги України (2009), Європейського червоного списку (1991), Резолюції 6 Бернської конвенції (1996) [2, 12].

S. hypanica – трав'яниста одно-дво-трирічна рослина заввишки 25–100 см. Стебло прямостояче, просте, у верхній частині розгалужене. Прикореневі листки довгасті (завдовжки 4–6 см), стеблові – яйцеподібно-ланцетні (завдовжки 2–8 см). Квітки червоні, зібрані у густе,

головчасте суцвіття. Чашолистки (завдовжки 16–18 мм) циліндричні, у верхній частині розширені, з трикутними зубчиками. Плід – коробочка завдовжки 7–9 мм. Цвіте у червні–липні. Плодоносить у липні–серпні. Мезофіт [11]. У природних умовах *S. hypanica* розмножується насінням і характеризується низькою конкурентною здатністю проростків та сходів, що обмежує його поширення. Оскільки цей вид є рідкісним і перебуває під загрозою зникнення, то для отримання якомога більшої кількості садивного матеріалу ми використовували різні методи розмноження, зокрема метод культури *in vitro*. Ця технологія розмноження дозволяє найбільш точно реалізувати потенціал рослин і на сьогоднішній день є головною складовою сучасних біотехнологій клонування і виробництва садивного матеріалу у селекції і рослинництві [6]. Розмноження *in vitro* *S. hypanica* – вдала альтернатива традиційним методам розмноження [3]. Не сьогодні нам не відома інформація щодо розмноження *S. hypanica in vitro* в умовах України.

Варто зазначити, що технології *in vitro*, розроблені для одного виду, не завжди можна використати для іншого, оскільки вони відрізняються за проявом морфогенної активності. У зв'язку з цим учені проводять дослідження регенераційної здатності тканин та органів рослин для кожного генотипу окремо.

Мета досліджень – з'ясувати залежність ризогенезу експлантів *S. hypanica* від концентрацій β -індолілмасляної кислоти та їх співвідношень у живильних середовищах з подальшою адаптацією рослин-регенерантів до умов *ex vitro*.

Матеріал і методи досліджень

У роботі використовували методи культури рослинних тканин та індукції морфогенних процесів *in vitro*, викликаних регуляторами росту. Культивування експлантів проводили у культуральній кімнаті з кондиційованим повітрям, на скляних стелажах, за температури $24 \pm 1^\circ\text{C}$, відносної вологості повітря 70–75%, фотоперіоду 16 годин і штучного освітлення інтенсивністю 2–3 тис. люкс. Посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища стерилізували згідно методик Калініна, Катаєвої; Мельничука та ін. [5, 6].

Для досягнення ризогенезу використовували експланти *S. hypanica*, одержані за умов асептичної культури *in vitro*. Здатність експлантів до укорінення та одержання рослин-регенерантів вивчали за використання живильного середовища Мурасіге і Скуга з додаванням β -ІМК (β -індолілмасляна кислота), у різних концентраціях (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мг/л) [11]. За контроль був прийнятий варіант живильного середовища І, без додавання β -ІМК.

Під час проведення експериментальних робіт використовували методики з культури ізольованих клітин, тканин і органів рослин та проводили математичну обробку отриманих результатів [1, 4, 5, 7, 8]. Дослідження проведено у лабораторії мікроклонального розмноження рослин Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України.

Результати досліджень та їх обговорення

Увесь процес мікроклонального розмноження рослин поділяють на кілька етапів: введення в культуру *in vitro* та одержання первинних експлантів; розмноження та створення умов, які б сприяли успішній реалізації морфогенного потенціалу експлантів для одержання високого коефіцієнту розмноження; підбір регулюючих ріст речовин для досягнення експлантами ризогенезу та одержання рослин-регенерантів; адаптація рослин-регенерантів до умов *ex vitro*.

Одним із ключових етапів мікроклонального розмноження рослин є ризогенез експлантів, для досягнення якого нами проведено модифікацію живильних середовищ. Отримані в асептичних умовах експланти, які мали сформовані розетки завдовжки 1,5–2,0 см, висаджували на живильне середовище Мурасіге–Скуга (МС) з половинним вмістом макро- і мікросолей, доповнене різними концентраціями β -ІМК (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мг/л). (таблиця).

Характеристика ризогенезу у рослин-регенерантів *S. hypanica*

Варіанти	ІМК, мг/л	Укорінення, %	Кількість коренів, шт./рослина	Довжина коренів, мм/рослина	Висота рослини, мм
I	0 (контроль)	0	0	0	
II	0,1	11,1	3,5±0,2	35,7±1,3	27,6±1,5
III	0,5	86,4	5,5±0,3	44,1±2,1	36,2±1,3
IV	1,0	64,3	3,4±0,2	38,1±2,3	33,7±2,1
V	1,5	41,5	3,1±0,1	28,5±1,8	29,2±1,4
VI	2,0	16,7	2,9±0,3	21,1±2,0	14,4±2,6

Початок ризогенезу спостерігали через 16 діб після висадження на живильні середовища для укорінення. Аналізуючи вплив різних концентрацій ІМК на ефективність ризогенезу, з'ясовано, що з досліджуваних найбільш ефективними виявилися варіанти з додаванням β-ІМК від 0,5 мг/л до 1,5 мг/л. Відсоток укорінених рослин становив 41,5–86,4%. Найбільш ефективним виявився варіант III, у якому до середовища МС додавали 0,5 мг/л β-ІМК. За такого складу живильного середовища впродовж 20–25 діб було отримано в середньому 86,4% укорінених рослин, які мали 5,5 шт. коренів у розрахунку на одну рослину; довжина коренів складала 44,1±2,1 мм, а висота рослин становила 36,2 ±1,3 мм (рис. 1). Зменшення концентрації β-ІМК до 0,1 мг/л та збільшення до 2,0 мг/л значно знижували відсоток укорінення, який відповідно становив 11,1 та 16,7%. У варіанті I, без додавання β-ІМК, який був контролем укорінення, експлантів не спостерігали. Тривалість пасажу в середньому складала 25–30 діб і залежала від умов культивування, темпу розмноження, характеру розвитку експланта.



Рис. 1. Ризогенез експлантів *S. hypanica*

Не менш складним етапом у процесі мікророзмноження рослин є адаптація рослин-регенерантів до умов *ex vitro*. На цьому етапі за несприятливих умов культивування загибель висаджених рослин може інколи досягати 80–100%. Це пов'язано з аномальним розвитком кореневої системи під впливом ауксину, відсутністю корневих волосків, порушеннями водного обміну у рослин-регенерантів, що зумовлено підвищеною транспірацією та зниженою здатністю до фотосинтезу пересаджених із пробірок укорінених рослин [6, 7]. На цьому етапі, при перенесенні рослин-регенерантів у нестерильні умови, значну увагу необхідно приділяти встановленню оптимальної фази розвитку рослин-регенерантів, під час якої вони мають найбільшу адаптивну здатність до нестерильних умов. Не кожна рослина, яка проросла у

пробірці і утворила корінь, здатна до адаптації. За даними наших спостережень, до адаптації здатні рослини з добре сформованою розеткою з 3–5 листками та з коренями завдовжки понад 12–20 мм. Такі рослини висаджували у торф'яні диски Juffy-7, попередньо оброблені перманганатом калію (KMnO_4) для адаптації до умов *ex vitro* (рис. 2). Менш розвинуті розетки *S. hypanica* відбирали окремо і висаджували на середовище МС з додаванням регуляторів росту для подальшого мікророзмноження з метою збільшення коефіцієнту розмноження та, відповідно, і кількості садивного матеріалу.

Для підтримання рівня вологості повітря торф'яні диски переносили в скляні акліматизаційні камери власного виробництва, у яких впродовж 3–4 діб вологість підтримувалась на рівні 80–90%.



Рис. 2. Адаптація рослин-регенерантів *S. hypanica* у торф'яних дисках

Після цього камери поступово відкривали, поетапно знижуючи вологість повітря, і за 8–10 діб її знижували до 70%. У рослин спостерігали формування нових листків та перші ознаки розростання розетки, що свідчило про успішність адаптації. Рослини пересаджували у контейнери з різними за складом ґрунтосумішами. Найбільш ефективним виявився субстрат з таким складом: ґрунт лісовий, пісок річковий, торф верховий моховий і перліт у співвідношенні відповідно 2:1:1:1, на якому добре відбувались приживання, ріст та розвиток рослин. Адаптація рослин у контейнерах відбувалася на стелажах адаптаційної кімнати за 16-годинного фотоперіоду, вологості повітря 70–80 % та за температури – 22–23 °С. За таких умов дорошування одержували близько 90% адаптованих рослин, придатних до пересаджування у нестерильні умови *in vivo*.

Висновки

Активному проходженню процесів ризогенезу сприяло додавання до живильного середовища МС β -індолілмасляної кислоти у концентрації 0,5 мг/л, що дало можливість одержати близько 86,4 % укоріненних рослин-регенерантів.

Для адаптування рослин-регенерантів *S. hypanica* до умов *ex vitro* найбільш доцільно пересаджувати рослини з пробірок у торф'яні диски Juffy-7 з подальшим дорошуванням у контейнерах за використання ґрунтосуміші такого складу: ґрунт лісовий, пісок річковий, торф верховий моховий та перліт у співвідношенні відповідно 2:1:1:1.

Вихід адаптованих рослин, придатних до висадження в умови *in vivo*, становив близько 90%.

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
2. Глобальная стратегия сохранения растений. BGCI: Rishmond, U. K., 2002. 16 с.

3. Джус Л. Л. Особливості насіннєвого розмноження *Silene hypanica* Klokov *in situ* та *ex situ*. *Автотхтонні та інтродуковані рослини*. Вип. 11. 2015. С. 203–207.
4. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М. : Агропромиздат, 1985. 351 с.
5. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К. : Наукова думка, 1980. 488 с.
6. Катаева Н. В. Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. М. : Наука, 1983. 96 с.
7. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К. : Логос, 2005. 730 с.
8. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин : підручник. К. : Поліграфконсалтинг, 2003. 520 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*: матеріали міжнар. наук. конф., 20–24 травня 2002 р. Одеса : ЛАТСТАР, 2002. Ч. II. С. 138–141.
10. Червона Книга України. Рослинний світ / за ред. Я. П. Дідуха. К. : Глобалконсалтинг, 2009. 912 с.
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.
12. 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.

References

1. Butenko R. G. Kul'tura izolirovannykh tkanej i fiziologija morfogeneza rastenij. M.: Nauka, 1964. 272 s. [in Russian]
2. Global'naja strategija sohraneniya rastenij. BGCI: Rishmond, U. K., 2002. 16 c. [in Russian]
3. Dzhus L. L. Osoblyvosti nasinnievoho rozmnozhennia *Silene hypanica* Klokov *in situ* та *ex situ*. *Avtokhtonni ta introdukovani roslyny*. Vyp. 11. 2015. S. 203–207. [in Ukrainian]
4. Dospheov B. A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy). M.: Agropromizdat, 1985. 351 s. [in Russian]
5. Kalinin F. L., Sarnackaja V. V., Polishhuk V. E. Metody kul'tury tkanej v fiziologii i biohimii rastenij. K.: Naukova dumka, 1980. 488 s. [in Russian]
6. Kataeva N. V. Butenko R. G. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij. M.: Nauka, 1983. 96 s. [in Russian]
7. Kunakh V. A. Biotekhnohiiia likarskykh roslyn. Henetychni ta fiziolohe-biokhimichni osnovy. K.: Lohos, 2005. 730 s. [in Ukrainian]
8. Melnychuk M. D., Novak T. V., Kunakh V. A. Biotekhnohiiia roslyn : pidruchnyk. K.: Polihrafkonsaltynh, 2003. 520 s. [in Ukrainian]
9. Sobko V. H., Haponenko M. B., Hnatiuk A. M., Derkach O. V., Minina Yu. V., Reshetiuk O. V. Repatriatsiia fitorarytetiv yak aktyvnyi zasib vidnovlennia populiatsii i pokrashchennia biolohichnoho stanu dovkillia. Rol botanichnykh sadiv v zelenomu budivnytstvi mist, kurortnykh ta rekreatsiinykh zon: materialy mizhnar. nauk. konf., 20–24 travnia 2002 r. Odesa: LATSTAR, 2002. Ch. II. S. 138–141. [in Ukrainian]
10. Chervona Knyha Ukrainy. Roslynnyi svit / za red. Ya. P. Didukha. K.: Hlobalkonsaltynh, 2009. 912 s. [in Ukrainian]
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.
12. 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.

L. Dzhus, L. Koldar

National Dendrological Park «Sofiyivka» of NAS of Ukraine, Ukraine

RHIZOGENESIS OF *SILENE HYPANICA* KLOKOV EXPLANTS AND THEIR ADAPTATION TO EX VITRO CONDITIONS

Among the conservation measures related to the preservation of plant diversity, an important place belongs to the creation and preservation of rare and endangered species in the crop conditions. Thus, the species *Silene hypanica* Klokov is under threat of extinction. This relict and endemic species is listed in the Red book of Ukraine, the European Red list, and 6th Resolution of the Berne Convention.

Prospects for the conservation of this species are related to the study of its viability and require the development of effective methods of reproduction, in particular *in vitro* crop. The article presents the results of studies of one of the breeding stages *in vitro* – rhizogenesis of *S. hypanica* explants and its dependence on the concentrations of β -indolyl butyric acid in nutrient media (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg / l), followed by adaptation of regenerating plants to *ex vitro* conditions. The study showed that the active process of rhizogenesis occurred due to the addition of β -IMC to the nutrient medium at a concentration of 0.5 mg/l and contributed to the production of 86.4 % of rooted regenerating plants. Transplanting rooted plants into peat disks and then growing them in containers contributed to the successful adaptation of rooted plants.

Key words: Silene hypanica, microclonal breeding, β -indolyl butyric acid, concentrations, regenerating plants, rooting, adaptation, substrate.

Надійшла 20.04.2020.