

УДК 582.521.42:581.165.7:631.589

А. Голубенко, канд. біол. наук, наук співр.

В. Цап, зав. сектора

НДЛ "Інтродукованого та природного фіторізноманіття", ННЦ "Інститут біології"  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна**КЛОНАЛЬНЕ МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН *ACORUS CALAMUS L.* IN VITRO**

У статті наведено дані про мікроклональне розмноження в асептичній культурі *Acorus calamus L.* Запропоновано ефективні модифікації модифікацію методик стерилізації первинного культивуального матеріалу та ініціації утворення адвентивних бруньок, пагонів з них та коренів *in vitro*.

**Ключові слова:** *Acorus calamus*, культура *in vitro*, мікроклональне розмноження

*Acorus calamus L.*, або лепеха звичайна – відома і популярна рослина, що має широкий спектр використання як лікарська, декоративна, фітотерапевтична, харчова та обрядова [1]. Завдяки наявності в кореневищах *A. calamus* до 5% ефірної олії, що містить ряд біологічно активних речовин, рослинна сировина лепехи широко використовується в фармацевтичній промисловості та народній медицині [2]. Це багаторічна трав'яниста рослина заввишки до 1,2 м, що росте на замулених піщаних ґрунтах по болотистих луках, болотах, по берегах і на мілководдях річок та озер, переважно в лісових і лісостепових районах, подекуди утворюючи великі зарості, застилаючи мілкі плеса. Розмножується лепеха у наших широтах лише вегетативно [1].

Сучасний ареал лепехи складається з чотирьох частин [3; 4]: азійська, сибірська, європейська, американська. Відомо декілька різновидів лепехи, які відрізняються за ступенем плідності – диплоїдний *A. calamus var. americanus* (поширений в Північній Америці, Східній Європі та Азії), стерильний триплоїдний *A. calamus var. calamus* (походить з Азії, розселився в багатьох районах Європи), тетраплоїдний *A. calamus var. spurius* (зустрічається в Східній Азії, в Росії, Казахстані, Східному Сибіру, на Далекому Сході, у Північному і Середньому Китаї, Японії), *A. calamus var. verus L.* (Євразія) [1; 5]. В Україні поширена лепеха звичайна в Європейській частині лісостепової зони (крім Карпат і Донецької області) [2-4]. Основні місця зростання - Тернопільська, Житомирська, Сумська, Полтавська, Черкаська, Вінницька, Хмельницька області; рідше трапляється у Волинській, Рівненській і Харківській областях. Лепеху занесено до регіональних Червоних книг у Дніпропетровській і Луганській областях. За останні кілька років різко зменшилась її кількість в басейнах річок Прип'ять, Стир, Случ, Тетерів, Стубла, Гнила Прип'ять, Південний Буг, Десна, Рось, Удай, Ворскла, Сіверський Донець, Орль. Лепеха також включена до списків Зеленої книги України [6]. Скорочення природних ареалів лепехи найчастіше пов'язують із технічним забрудненням водойм, де вона росте, зі збором її у майже промислових масштабах для виготовлення лікарських препаратів, створенням пляжів у місцях зростання.

Існує необхідність подальшого всебічного дослідження *A. calamus* як джерела біологічно активних речовин та об'єкта інтродукції. На сьогодні залишається нез'ясованим цілий ряд питань стосовно біохімічних, генетичних, морфогенетичних та інших відмінностей між різними популяціями лепехи, недостатньо досліджені особливості культивування *in vitro* та регуляції продуктивності в умовах стерильної культури. Відомо, що рослини *A. calamus* різної плідності генетично різняться за продуктивністю. За хімічними критеріями, їх об'єднують у хімічні різновиди – хеморасами. Ми припускаємо, що в Україні також існують окремі хемораси *A. calamus*. Тому мета нашої роботи – введення в культуру *in vitro* рослин різних популяцій *A. calamus*, створення асептичної колекції генотипів аїру та розробки технології розмноження лепехи в контрольованих умовах.

**Матеріали і методи.** Досліджувались зразки *A. calamus* з 5-ти локалітетів Київської області: р. Томилівка у с. Томилівка Білоцерківського району; залівні луки на південь від смт. Володарка Володарського р-ну; болотиста місцевість поряд із с. Білівка Ружівського р-ну; два локалітети у м. Біла Церква – залівні луки в районі "Заріччя" та поряд з "Дерев'яним мостом". За морфологічними ознаками особливих відмінностей між рослинами з різних місць зростання нами не виявлено, проте розміри листків лепехи, взятої з залівного луку у м. Біла Церква були дещо меншими від інших досліджуваних рослин, що пояснюється більш жорсткими умовами зростання (місцевість часто пересихає). Для введення лепехи в стерильну культуру коренями відмивали проточною водою від субстрату, в якому зростали рослини, видаляли всі корені, залишки відмерлих покривних тканин та ще тричі промивали мильною та проточною водою, після чого виділяли ділянки кореневища з брунькою, які стерилізували поетапно у 70%-му етиловому спирті протягом 1 хв. та 0,1%-му розчині  $HgCl_2$  протягом 3-15 хв., трикратно промивали стерильною дистильованою водою, висаджували на рідке або агризоване живильне середовище і культивували при температурі 24°C та 16-годинному фотоперіоді. Паралельно застосовувався розроблений нами метод механічної ізоляції меристем.

Базовим живильним середовищем для введення в культуру *A. calamus* було середовище Мурасіге-Скуга (МС) з розведеним удвічі вмістом мінеральних макро- і мікроелементів (МС/2) та додаванням 100 мг/л мезоіонізу, вітамінів (В<sub>1</sub> і В<sub>6</sub> – по 0,5 мг/л, РР – 1 мг/л), 20 г/л сахарози та регуляторів росту у різних концентраціях та їх поєднаннях (індолилцетової кислоти – ІОК, нафтилцетової кислоти та бензиламінопурину БАП) [7].

**Результати та обговорення. Оптимізація методик стерилізації вихідного садивного матеріалу аїру.** З очищення від субстрату та промитих проточною водою кореневищ вирізали частини з латеральними бруньками, які мали розмір від 5 до 1,5 мм. Потім бруньки з частинами кореневища промивали мильною водою з додаванням розчину "Білизни", проточною водою – протягом 10 хвилин та ще тричі – дистилатом. Стерилізували декількома способами. Фрагменти рослин стерилізували поетапно у 70%-му етиловому спирті протягом 1 хв. та 0,1%-му розчині  $HgCl_2$  протягом 3-5 хв., трикратно промивали стерильною дистильованою водою, висаджували на живильне середовище і культивували при температурі 24°C та 16-годинному фотоперіоді. У нашому досліді за такого способу стерилізації спостерігалась контамінація усіх використаних зразків. Це дозволило зробити висновок про неефективність стерилізації за даною методикою.

Оскільки рівень контамінації можливо знизити збільшенням експозиції у стерилізуючій речовині, наступними варіантами досліду були: 1 хв. в етанолі + 7-8 хв. у 0,1 %  $HgCl_2$ ; 1 хв. в етанолі + 9-10 хв. у 0,1 %  $HgCl_2$ ; 1 хв. в етанолі + 11-12 хв. у 0,1 %  $HgCl_2$ . Результатом проведених експериментів стало зниження частоти випадків контамі-

нації. Для кожного досліджу брали по 5 фрагментів кореневища з брунькою (у 3-х повторностях) (табл. 1).

Таким чином, третій варіант досліджу можна було б вважати найефективнішим і застосовувати його для

подальшої роботи. Проте, необхідним показником ефективності є також виживання експлантів, яке при збільшенні експозиції різко знижувалось (табл. 1).

Таблиця 1

**Залежність успішності стерилізації та фрагментів життєздатності кореневища аїру з брунькою від тривалості експозиції у хлориді ртуті при введенні в культуру *in vitro***

Тривалість експозиції у 0,1 % HgCl <sub>2</sub>	7-8 хв.	9-10 хв.	11-12 хв.
Відсоток стерильних експлантів	46,7 %	53,3 %	73,3 %
Кількість живих експлантів	42,9%	37,5%	18,2%

Отже, даний метод виявився непридатним для введення в культуру *in vitro*, оскільки він здатен забезпечити стерильність, але не життєздатність рослинних об'єктів.

Тому нами було відпрацьовано оригінальний метод механічної ізоляції нестерильних тканин, який показав більш ефективні результати стерилізації первинного садивного матеріалу. Так, в результаті проведених повторних експериментів, отримано 71,43%, 75%, 62,5%, тобто, в середньому, 69,64% стерильних живих експлантів, придатних для вирощування та розмноження *in vitro*. Таким чином, метод механічної ізоляції нестерильних тканин дозволив мінімізувати втрати садивного матеріалу при введенні в асептичну культуру і забезпечив 100%-ве виживання тих експлантів, які вдалося простерилізувати. Використаний нами метод показав, що в даному випадку це єдиний мінімально травматичний та, водночас, найефективніший, спосіб стерилізації

фрагментів кореневища аїру з латеральними бруньками при введенні його в культуру *in vitro*.

**Ініціація адвентивних бруньок і пагонів у експлантів аїру *in vitro*.** Мінімальний вміст у живильному середовищі БАП концентрацією 1,5-2 мг/л – не викликав помітних морфогенетичних реакцій. Можна було спостерігати тільки незначні потовщення біля основи пагонів або появу поодиноких мікроклонів (1 на 10 експлантів) (рис. 1, а).

Підвищення концентрації цитокініну до 2,5-3 мг/л в присутності ІОК та НОК викликало активізацію розвитку додаткових (адвентивних) меристем, а через 4-6 тижнів – формування мікрокущів, які складались з 3-5 пагонів завдовжки 10-20 мм (рис. 1, б), суттєвої різниці між варіантами концентрацій бензиламінопурина (2,5-3 мг/л) не спостерігалось (табл. 2).



а



б

Рис. 1. Вплив концентрації БАП на формування мікроклонів аїру:  
а) 1,5-2 мг/л; б) 2,5-3 мг/л

Таблиця 2

**Середня кількість адвентивних пагонів аїру на експлант при різних концентраціях БАП у живильному середовищі**

Концентрації цитокініну	БАП			
	1,5 мг/л	2 мг/л	2,5 мг/л	3 мг/л
Кількість мікроклонів на експлант	0,2	0,25	2,8	3,0

Розділення мікрокущів та повторні пересадки на середовища для мікроклонального розмноження сприяли збільшенню його швидкості (вже через місяць з'являлись перші додаткові пагони). При цьому кількість нових адвентивних пагонів (мікроклонів) не перевищувала 4 шт. на материнський експлант. Таким чином, оптимальним середовищем для мікроклонального розмноження аїру можна вважати живильне середовище МС/2 з додаванням 0,1 мг/л ІОК і 2,5 – 3 мг/л БАП.

За умов розділення мікроклонів кожних 3 місяці та повернення їх у цикл мікроклонального розмноження за рік можна отримати понад 200 рослин за рік з одного материнського експланта (без урахування попередньо-

го періоду введення в культуру та ініціації первинного морфогенезу).

**Укорінення мікроклонів аїру *in vitro*.** Мікроклони аїру, одержані в результаті клонального мікророзмноження, знаходились на його поверхні і не мали коренів та потребували укорінення. Тому наступним етапом наших досліджень було вивчення здатності мікроклонів до ризогенезу.

Для індукції ризогенезу ми відокремлювали пагонирегенеранти, які досягли 2-3 см завдовжки, від мікрокуща і пересаджували їх на живильні середовища з додаванням ауксинактивного регулятора росту НОК (0,05-0,1 мг/л). Всього для досліджу було взято 34 мікроклони

– 10 культивували на МС/2 без регуляторів росту, по 12 – на середовищі МС/2, доповненому 0,05 та 0,1 НОК.

За нашими спостереженнями, як первинні експланти, так і регенеранти-мікроклони аїру виявили здатність

до спонтанного укорінення на безгормональному середовищі МС з розведеним удвічі вмістом макро- і мікро-солей. Таке явище ми спостерігали у 2 випадках з 10-ти (рис. 2, а, б).



а



б

Рис. 2. Ризогенез *in vitro* аїру:

а) укорінений мікроклон; б) корінь – вид пробірки знизу

Додавання до живильного середовища 0,05 мг/л нафтилоцтової кислоти виявляло слабку стимулюючу дію та викликало утворення коренів у 7 мікроклонів з 12. НОК у концентрації 0,1 г/л ініціювало ризогенез у 11 пагонів аїру. Таким чином, на живильному середовищі МС/2, доповненому 0,1 мг/л НОК, нами отримано ризогенез у 100% випадків (1 рослина була не укорінена, оскільки загинула через контамінацію). Це дозволяє стверджувати, що таке середовище придатне для масового укорінення мікроклонів аїру.

**Висновки.** Запропоновано і відпрацьовано альтернативний описаному в літературі спосіб стерилізації первинних експлантів - метод механічної ізоляції нестерильних тканин. Підібрано оптимальне живильне середовище для клонального мікророзмноження аїру *in vitro*, яке містить 2,5-3 мг/л бензиламінопурина. Встановлено, що для ризогенезу мікроклонів лепехи *in vitro*, необхідне живильне середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти. За умови розділення мік-

роклонів кожних 3 місяці та повернення їх у цикл мікронального розмноження за рік можна отримати понад 200 рослин за рік з одного материнського експланта.

#### Список використаних джерел

1. Жизнь растений: В 6 томах / Гл. ред. А.Л. Тахтаджян // Т.6. Цветковые растения / Под ред. А.Л. Тахтаджяна. – М.: Просвещение, – 1982 – С. 469-471.
2. Сіра А.Ю. Фармацевтична ботаніка/ І.Д. Сербін, Б.Г. Слободянюк. – Вінниця: Нова книга, 2007. – С. 96-98.
3. Ботаника. Энциклопедия. Все растения мира // Пер. с англ. Ред. Д. Григорьев и др. – М.: Копетанн, 2006 - С. 54.
4. Чопик В.И. Дикорастущие полезные растения Украины: Справочник. – К.: Наукова думка, 1983. – С. 126.
5. <http://magicplants.ru/articles/air-bolotnyj/>
6. Зелена книга України / під ред. члена-кореспондента НАН України Я.П. Дідуха – К.: Альтерпрес, 2009. – 448 с.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacc tissue cultures // *Physiol. plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

Надійшла до редколегії 05.11.15

A. Golubenko, PhD, scientist

V. Tsap, head of sector

Scientific-research laboratory of "Introduced and natural phytodiversity"

Educational and Scientific Centre "Institute of Biology"

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

#### CLONAL MICROPROPAGATION OF *ACORUS CALAMUS* L. PLANTS IN VITRO

The article contains data on introduction of *Acorus calamus* L. to aseptic culture. An efficient modification of primary cultivational material sterilization method was developed. The explant *in vitro* morphogenesis ability was discovered.

Keywords: *Acorus calamus*, culture *in vitro*, clonal micropropagation.

A. Голубенко, канд. биол. наук, научн. сотр.

В. Цап, зав. сект.

НИЛ "Интродуцированного и природного фиторазнообразия"

УНЦ "Институт биологии", Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

#### КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ *ACORUS CALAMUS* L. IN VITRO

В статье представлены данные о введении в асептическую культуру *Acorus calamus* L. Разработана эффективная модификация методики стерилизации первичного культивационного материала. Выявлена способность эксплантов к морфогенезу *in vitro*.

Ключевые слова: *Acorus calamus*, культура *in vitro*, микроклональное размножение