

ОСОБЛИВОСТІ ІНЦІАЦІЇ ТА ФОРМУВАННЯ МІКРОЦИБУЛИН У *GALANTHUS NIVALIS* L. ТА *GALANTHUS PLICATUS* M. ВІЕВ. *IN VITRO*

Культура *in vitro* є одним із найефективніших методів для збереження рослин за межами їх природних ареалів (*ex situ*) і використовується як для отримання великої кількості рослинного матеріалу з метою подальшого вирощування в умовах інтродукції або проведення реінтродукції та репатріації, так і для створення генетичних банків. Інтродукційні та *in vitro* колекції – це не лише спосіб «консервації» генофонду, а й база для фізіологічних, біохімічних, молекулярно-генетичних досліджень рідкісних рослин, тому вони активно створюються як в Україні [1–3], так і поза її межами [4, 5].

Усі види роду *Galanthus* L. (Підсніжник), які зростають на території України, є рідкісними рослинами, потребують охорони і занесені до Червоної книги України [6]. Підсніжники – декоративні рослини, які квітнуть рано навесні і в період квітання масово винищуються на букети, крім того, їхні природні ареали поступово зменшуються внаслідок вирубування лісів, випалювання трав'яного покриву галявин і узлісь, через що заходи їх збереження *in situ* є малоєфективними [6]. Застосування методів культури рослинних тканин здатне в рази збільшити коефіцієнт розмноження для вирощування в умовах інтродукції, так і для повернення їх у природні місця зростання (репатріації чи реінтродукції).

Galanthus nivalis L. та *Galanthus plicatus* M. Vieb. – червонокнижні види, які потребують охорони у місцях природного зростання та поза їх межами [6], інтродуковані та входять до складу колекції рідкісних рослин Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна КНУ імені Тараса Шевченка [7]. Можливість самовідновлення природних популяцій надзвичайно ускладнена низьким коефіцієнтом розмноження підсніжників – у природних умовах одна цибулина утворює лише одну дочірню за 2 роки. Для відновлення популяцій цих видів підсніжника у місцях природного зростання необхідна велика кількість садивного матеріалу, масове отримання якого можна забезпечити шляхом мікроклонального розмноження взятих із природи чи інтродукованих рослин.

Морфогенез рослин *in vitro* має видоспецифічні (а іноді – популяційноспецифічні) особливості, що потрібно враховувати при розробці індивідуальних технологій клонального мікророзмноження. Тому, метою нашого дослідження стало вивчення морфогенезу *G. nivalis* та *G. plicatus in vitro*, виявлення їхньої морфогенетичної здатності та спостереження за основними етапами формування мікроцибулин-регенерантів із застосуванням анатомо-морфологічних методів.

Матеріали і методи

Роботу виконували у лабораторії біотехнології рослин Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка у два етапи: експерименти з культивативним матеріалом *G. plicatus* проводились у період з квітня 2015 р. по грудень 2016 р., з *G. nivalis* – з серпня 2015 р. по січень 2016 р. Первинним матеріалом для введення в асептичну культуру були вирощені в ґрунтовій колекції Ботанічного саду [9] цибулини *G. nivalis* та *G. plicatus*. Для досліджень морфогенезу підсніжників використовували методи культури рослин *in vitro* [8].

Високу імовірність контамінації первинних експлантів, вилучених з ґрунту, нам вдалося суттєво знизити, застосувавши кілька етапні підготовки цибулин до введення в асептичну культуру. Насамперед, їх просушували за кімнатних умов і очищували від часточок ґрунтового субстрату та сухих зовнішніх лусок. Очищені цибулини ретельно промивали мильним розчином та проточною водою. Далі, за стерильних умов, проводили 4-етапну поверхневу стерилізацію: занурювали у 70%-й етанол на 30 с, переносили у 0,1 % розчин HgCl₂ (хлорид ртуті) на 12 хв., тричі промивали стерильною дистильованою водою і витримували протягом 20 хв. у 15%-му розчині пероксиду водню. Після останнього етапу поверхневої стерилізації, без додаткового промивання, цибулини підсніжників просушували на стерильному фільтрувальному папері, розрізали на декілька частин (вздовж або впоперек), розділяли на окремі

луски і поміщали на поверхню живильного середовища. Експланти культивували за температури 24°C та 16-годинного фотоперіоду.

Усі субстрати готували на базі агаризованого живильного середовища Мурасіге-Скуга [10] з розведеним удвічі вмістом мінеральних макро- і мікроелементів (МС/2), доповненого вітамінами (В₁ і В₆ – по 0,5 мг/л, РР – 1 мг/л), 100 мг/л мезоінозиту, 20 г/л сахарози, цитокінінактивними (кінетин і 6-бензиламінопурин – БАП) та ауксинактивними (індолилцетова – ІОК та 1-нафтилоцетова – НОК кислоти) регуляторами росту. Ауксини у всіх середовищах використовувалися в однаковому поєднанні концентрацій: 0,2 мг/л ІОК і 0,1 мг/л НОК. Концентрації цитокінінів у живильних середовищах варіювали від 0,75 мг/л до 2,5 мг/л. Оскільки поєднання ауксинів у всіх дослідках було сталим, надалі в описах результатів експериментів згадуватимуться лише варіативні складники середовища (цитокініни). Відомо, що у переважній більшості випадків для ініціації адвентивних бруньок (пагонів, мікроцибулин) потрібні низькі концентрації ауксинів у поєднанні з декілька разів вищими – цитокінінів, при чому цитокініни відіграють вирішальну роль [7, 8, 11], тому цю властивість ми використали для планування експерименту.

Уведення в культуру *in vitro* *G. plicatus* та *G. nivalis*. Для *G. plicatus* було проведено скрінінг на здатність ініціювати мікроклонування чотирьох середовищ з 6-бензиламінопурином (0,75; 1,0; 1,25 і 1,5 мг/л). Для *G. nivalis* було протестовано два середовища з 6-бензиламінопурином (1 і 1,5 мг/л), і два – з кінетином (2 і 2,5 мг/л). Нижчі концентрації БАП, порівняно з кінетином, зумовлені тим, що кінетин менш активний і, зазвичай, для стимуляції ним морфогенетичних реакцій потрібні вищі його концентрації, порівняно з БАП [8]. У літературних джерелах описані результати застосування БАП для отримання регенерантів у підсніжника [7, 11], проте, кінетин з цією метою застосовувався нами вперше.

Для анатомічного дослідження використовували морфогенний калюс *G. plicatus* та

G. nivalis різного віку і сформовані з нього адвентивні бруньки (мікроцибулини). Зразки фіксували у ФАА (формалін:ацетат:алкоголь – 5:5:90), заливали у желатин за стандартною методикою [12] та виготовляли поперечні та поздовжні зрізи завтовшки 10 мкм за допомогою заморожуючого мікротома. Зрізи зафарбовували ацетоорсеїном та сафраніном [13]. Об'єкти досліджувалися на мікроскопі XSP-146TR та тринокулярному мікроскопі Konus Crystal-45. Фотографії зроблені за допомогою цифрової камери Canon 100 D.

Результати та обговорення

За даними літератури, ефективним для мікроклонування підсніжників було модифіковане живильне середовище МС, доповнене 0,1 мг/л НОК і 1 мг/л БАП, за використання якого було отримано, в середньому, 2,73 мікроцибулини на експлант [7]. Для виявлення наявності (або відсутності) генотипової специфіки досліджуваних об'єктів, паралельно з основними експериментами, було додатково протестоване середовище і зі згаданим вище поєднанням регуляторів росту. У результаті проведених досліджень виявилось, що у контрольному варіанті мікроклонування було ініційоване у 50 % експлантів *G. plicatus* та *G. nivalis*, у середньому по 1,36 регенеранти на експлант.

Формування мікроцибулин у *G. plicatus*.

Введення у первинну культуру *G. plicatus* припало на весняний період, після закінчення квітучання. Цибулини підсніжника в цей час знаходяться у стані спокою, і це помітно відобразилося на інтенсивності їхнього морфогенезу *in vitro*: утворення морфогенного калюсу та регенерантів-мікроцибулин із нього відбувалося повільно і перші чітко сформовані мікроклони з'явилися лише у жовтні – через 5 місяців культивування. Проте, починаючи з вересня, швидкість розвитку як морфогенного калюсу, так і появи цибулин, зростає і переважна більшість регенерантів утворилася у період з жовтня до середини грудня (рис. 1).

Отримані результати показали, що для ініціації мікроклонування досліджуваного генотипу

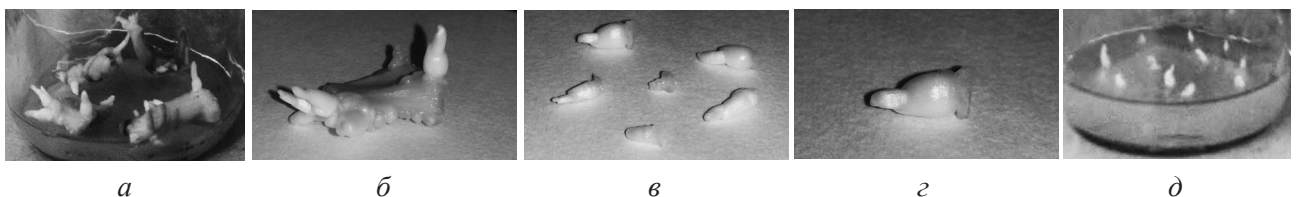


Рис. 1. Регенерація мікроцибулин *G. plicatus in vitro*: а, б – первинні експланти з мікроклонками; в, г – відокремлені мікроцибулини; регенеранти, висаджені на середовище для дорощування

G. plicatus живильне середовище з додаванням 1 мг/л БАП неефективне, що підтверджує наше припущення, що у підсніжників, як і у багатьох інших видів, наявна генотипова внутрішньовидова специфіка морфогенезу (наприклад, на рівні популяції), та вказує на необхідність додаткового дослідження цього питання.

Найефективнішим для мікроклонування *G. plicatus* виявилось живильне середовище МС, доповнене 1,25 мг/л БАП (табл. 1), на якому сформувалося з 10-ти сегментів материнських цибулин 54 регенеранти, придатні для відокремлення від первинного експланта (понад 3 мм завдовжки), та велика кількість дрібних, які потребують дорошування.

Формування мікроцибулин у *G. nivalis*.

Введення у первинну культуру *G. nivalis* проводили у період переходу підземної частини рослин до активного росту, у кінці серпня-вересні. Це допомогло отримати регенеранти значно швидше, ніж у *G. plicatus*, що свідчить про необхідність урахування природних біоритмів при введенні підсніжників в асептичну культуру і підтверджує літературні дані [7]. Уже через 5–6 тижнів культивування було відмічено появу морфогенного калюсу, який швидко наростав і переходив до диференціації, а через 3–4 місяці спостерігалось утворення добре розвинутих мікроцибулин, готових до відокремлення від материнських експлантів (рис. 2).

Дослідження показали, що вміст у живильному середовищі 1 мг/л БАП стимулював регенерацію у 57,14 % експлантів *G. nivalis* (1,43 мікроцибулини на експлант), а для 1,5 мг/л БАП ці показники становили 46,15 % (2,0 мікроцибулини) (табл. 2). Обидва показники наближені до ефективності регенерації підсніжника на середовищі з додаванням 1 мг/л БАП у поєднанні з 0,1 мг/л НОК (50 % регенерації, 1,36 мікроцибулини на експлант), проте кількість мікроклонів на експлант в обох випадках була дещо вищою. Такі показники можна пояснити наявністю в наших експериментальних середовищах додаткового ауксину – ІОК, який виконує стимулюючу морфогенез функцію.

У досліді з додаванням до живильного середовища 2 мг/л та 2,5 мг/л кінетину спостерігали мікроклонування у 50 % та 83,3 %, відповідно. При цьому, середовище, доповнене 2 мг/л кінетину, ініціювало утворення 3,67, а 2,5 мг/л – 1,83 регенеранти на експлант (табл. 2).

Отже, найефективнішим з досліджених живильних середовищ для ініціації утворення мікроцибулин у *G. nivalis* було середовище з додаванням 2 мг/л кінетину у поєднанні з 0,2 мг/л ІОК та 0,1 мг/л НОК. Але, оскільки регенерація підсніжників подекуди супроводжувалась вітрифікацією та частковим некрозом вихідних експлантів і новоутворених мікроцибулин, необхідне продовження експериментів з подальшої оптимізації

Таблиця 1

Вплив 6-бензиламінопурину на регенерацію мікроцибулин *G. plicatus in vitro**

Концентрація БАП, мг/л	Кількість первинних експлантів, шт.	Кількість експлантів з регенерантами, шт. / Частота регенерації, %	Кількість регенерантів, шт. / Кількість регенерантів на первинний експлант, шт.	Примітки
0,75	17	2 / 11,76	8 / 0,47	вітрифікація
1,0	10	3 / 30,0	7 / 0,7	некроз, вітрифікація
1,25	9	8 / 88,89	54 / 6,75	здорові, добре сформовані мікроцибулини
1,5	9	—	—	багато дрібних, вітрифікованих мікроцибулин

Примітка. * – Враховано лише повноцінно розвинуті регенеранти-мікроцибулини.

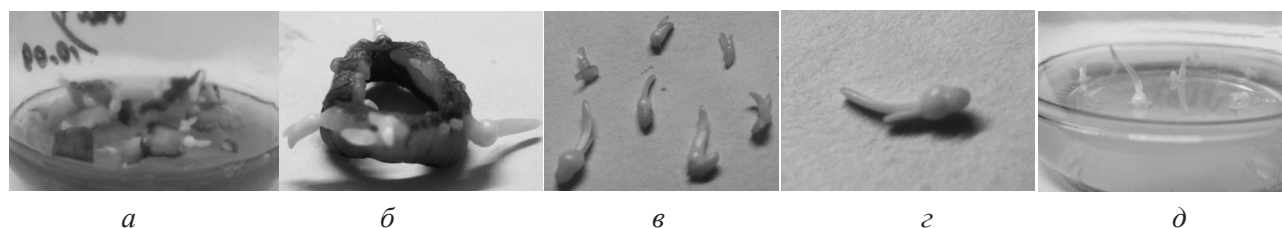


Рис. 2. Регенерація мікроцибулин *G. nivalis in vitro*: а, б – первинні експланти з мікроклони; в, г – відокремлені мікроцибулини; регенеранти, висаджені на середовище для дорошування

Вплив БАП та кінетину на регенерацію мікроцибулин *G. nivalis in vitro**

Концентрація цитокінінів, мг/л	Кількість первинних експлантів, шт.	Кількість експлантів з регенерантами, шт. / Частота регенерації, %	Кількість регенерантів, шт. / Кількість регенерантів на первинний експлант, шт.	Примітки
БАП 1	7	4 / 57,14	10 / 1,43	вітрифікація
БАП 1,5	13	6 / 46,15	26 / 2,0	вітрифікація
Кін 2	12	6 / 50,0	44 / 3,67	сформовані мікроцибулини
Кін 2,5	12	10 / 83,3	22 / 1,83	сформовані мікроцибулини

Примітка. * – Враховано лише повноцінно розвинуті регенеранти-мікроцибулини.

трофічних і фізичних умов розмноження та культивування *G. plicatus* та *G. nivalis in vitro*. Також, важливим етапом досліджень є ініціація ризогенезу у мікроцибулин та прискорення їхнього росту і збільшення маси, достатньої для переведення в умови *in vivo*.

Анатомічні дослідження морфогенного калюсу та мікроцибулин підсніжників показали, що морфогенний калюс на ранніх стадіях диференціації характеризуються наявністю епідерми та закладенням у центрі калюсного виросту зони активного поділу, оточеної паренхімними клітинами (рис. 3 а, 4 а). Центри активного поділу складаються з дуже щільно розміщених дрібних клітин з великим ядром і малим вмістом цитоплазми. При подальшому розвитку від апікальної частини зони поділу відмежовується шар паренхімних клітин, утворюючи обкладку, оточену адаксіальною та абаксіальною епідермою (рис. 3 б). Починаючи з 12–16 тижня культивування експлантів *G. nivalis*, можна спостерігати утворення бруньки з апікальною зоною росту та

двома примордіальними листками (рис. 3 в). Над верхівкою бруньки клітини обкладки частково елімінують, утворюючи окремі листки обкладки (рис. 3 г), що дозволяє першим двом листкам збільшуватися в розмірі. Листки обкладки в подальшому формують луски цибулини.

Розвиток морфогенного калюсу *G. plicatus* відрізняється тим, що швидкість наростання листків обкладки значно переважає швидкість формування бруньки, порівняно з *G. nivalis*. Візуально це спостерігається як формування кулястої цибулини *G. plicatus*, з центру якої листки з'являються лише через 3–4 тижні, та майже одночасна поява цибулини й листків у *G. nivalis*.

Висновки

Морфогенетична здатність первинних експлантів *G. plicatus* та *G. nivalis* залежить від сезонних біоритмів цих видів і є оптимальною для введення в культуру *in vitro* в осінній період. У підсніжників, як і у багатьох інших видів, наявна генотипова внутрішньовидова специфіка морфо-

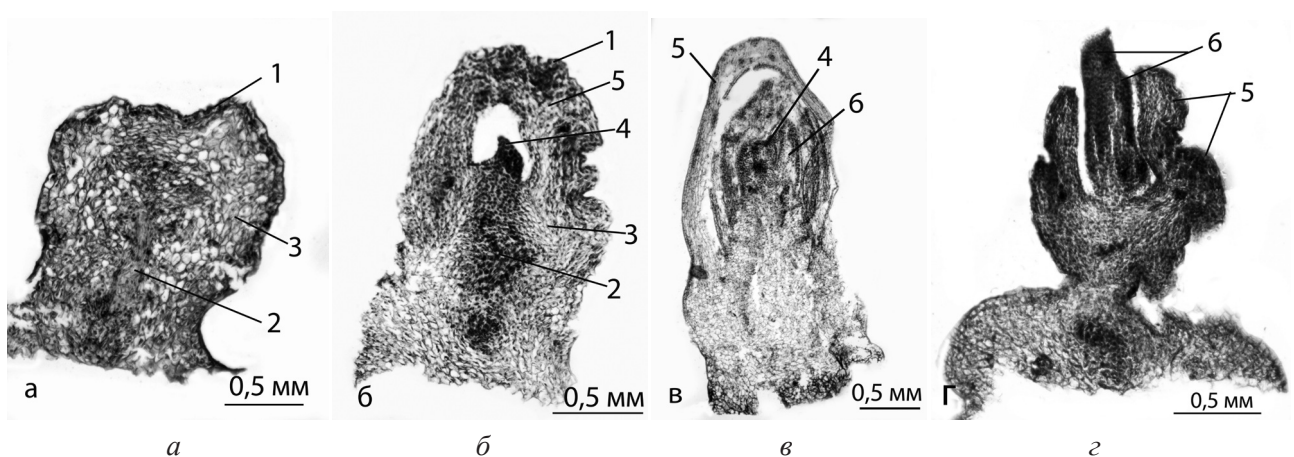


Рис. 3. Стадії розвитку мікроцибулини з морфогенного калюсу *G. nivalis*: а – початкова стадія диференціації; б, в, г – стадії формування мікроцибулини: 1 – епідерма, 2 – зона активного поділу, 3 – паренхіма, 4 – апікальна зона бруньки, 5 – обкладка з клітин морфогенного калюсу, 6 – примордіальні листки

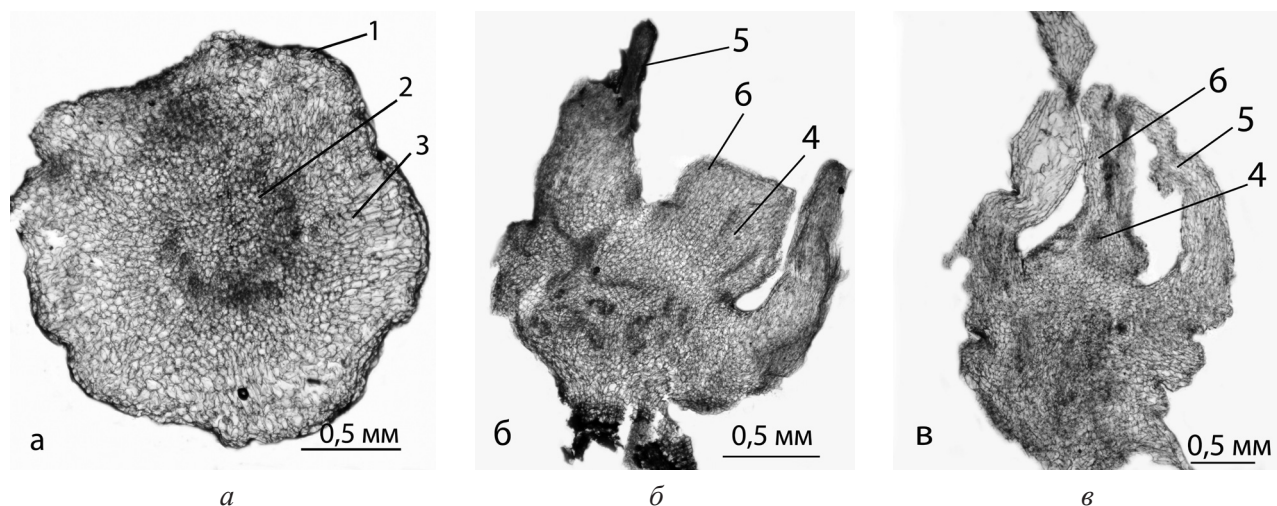


Рис. 4. Стадії розвитку морфогенного калюсу *G. plicatus*: а – поперечний переріз; б, в – поздовжній переріз: 1 – епідерма, 2 – зона активного поділу, 3 – паренхіма, 4 – апікальна зона бруньки, 5 – обкладка з клітин морфогенного калюсу, 6 – примордіальні листки

генезу. Органогенез у обох видів залежить більшою мірою від цитокінінів. Застосування кінетину для ініціації мікроклонування *G. nivalis* виявилось більш ефективним, порівняно з 6-бензиламінопурином. Отже, досліджувані види підсніжника мають суттєві морфогенетичні відмін-

ності, які проявляються як в індивідуальній реакції на вміст цитокінінактивних регуляторів росту в живильних середовищах та у різних темпах розвитку регенерантів, так і в різному порядку формування частин мікроцибулини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Белокурова В.Б. Методи біотехнології в системі заходів зі збереження біорізноманіття рослин // Цитология и генетика. – 2010. – № 3. – С. 58–72.
2. Капустян В.В. Збереження інтродукційного та аборигенного рослинного різноманіття в умовах культури // Вісн. КНУ імені Тараса Шевченка. Сер.: Інтродукція та збереження рослинного різноманіття. – 2000. – Вип. 3. – С. 5–7.
3. Мартинюк В.О., Голубенко А.В., Гуменюк Г.Б. Уведення в асептичну культуру рідкісної ендемічної рослини *Atocion lithuanicum* (Zaral.) Tzvel. // Фактори експериментальної еволюції: зб. наук. праць / Під. ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – К.: Логос, 2014. – 15. – С. 102–106.
4. Fay, Michael F. Conservation of Rare and Endangered Plants Using *in vitro* Methods / *In vitro* Cellular & Developmental Biology // Plant. – 1992. – 28 P, No 1. – P. 1–4.
5. Евсеева Н.Н. Перспективы восстановления численности некоторых охраняемых растений: автореф. дис. ..канд. биол. наук: 03.00.05. – М.: Гл. ботан. сад РАН, 2003. – 18 с.
6. Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Дідуха Я.П. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
7. Selby Ch., Staikidou I., Hanks G.R., Hughes P. Snowdrops: Developing cost-effective production methods through studies of micropropagation, agronomy and bulb storage // HDS Project BOF 48. Final Report. – 2005, Horticultural Development Council. – 93 p.
8. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наукова думка, 2005. – 272 с.
9. Березкіна В.І. та ін. Ботанічний сад ім. акад. О.В. Фоміна. Каталог рослин. – Природно-заповідні території України. Рослинний світ. Вип. 7 – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 320 с.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. plant.* – 1962. – 15. – P. 473–497.
11. Resetár A., Demeter Z., Ficsor E., Balázs A., Mosolygó Á., Szőke É., Gonda S., Papp L., Surányi G., Máthé C. Growth regulator requirement for *in vitro* embryogenic cultures of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) suitable for germplasm preservation // *Acta Biol. Hung.* – 2014. – 65, N 2. – P. 165–167.
12. Ромейс Б. Микроскопическая техника. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1954. – 718 с.
13. Паушева З. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.

GOLUBENKO A.V., NUZHYNIA N.V., HOLUBENKO A.S.

Educational and Scientific Centre «Institute of Biology» of the Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64/13, e-mail: holubenko@yahoo.com

PECULIARITIES OF *GALANTHUS NIVALIS* L. AND *GALANTHUS PLICATUS* M. BIEB. MICROBULBS INITIATION AND FORMATION *IN VITRO*

Aim. The purpose of our investigation was to study the morphogenesis, detect morphogenetic ability and observe the main stages of microbulb regenerant formation of rare galanthus species (*Galanthus nivalis* L. and *Galanthus plicatus* M. Bieb.) *in vitro* using anatomico-morphogenetic methods. **Methods.** In the study, *in vitro* plant culture and anatomico-morphogenetic methods were used. **Results.** It had been determined that to acquire microbulbs of the investigated species, the optimal nutrient medium was Murashige-Skoog with addition of 1.25 mg/l of BA (for *G. plicatus*) and 2 mg/l of kinetin (for *G. nivalis*). The development of *G. plicatus* callus is distinguished by much slower bud formation than growth of the of sheath leaves. In *G. nivalis*, the growth of the sheath leaves and bud formation occur almost at the same rate. **Concluisions.** *G. plicatus* and *G. nivalis* have substantial morphogenetic differences, which reveal themselves in individual reaction to cytokinin-active growth regulators in the nutrient media and different time of regenerant development as well as in order of microbulb parts formation.

Keywords: *Galanthus nivalis*, *Galanthus plicatus*, *in vitro* culture, clonal micropropagation, microbulb, plant anatomy.