

Д.А. СКЛЯРЕНКО, А.М. БУГАРА

Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського,
пр. Вернадського, 4, м. Сімферополь, 95007

**ВИКОРИСТАННЯ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ
ONOBRYCHIS PALLASII (WILLD.) ВІЕВ. З МЕТОЮ ЗБЕРЕЖЕННЯ
ВИДУ**

Ключові слова: *Onobrychis pallasii*, ембріокультура, калус, збереження біорізноманіття

Key words: *Onobrychis pallasii*, embrioculture, callus, preserving biodiversity

D. SKLYARENKO, A. BUGARA

**USE THE CLONE MIKROREPRODUCTION OF *ONOBRYCHIS PALLASII*
(WILLD.) ВІЕВ. FOR THE PURPOSE OF CONSERVATION SPECIES**

National Taurida V. Vernadsky University
4 Vernadskogo av., Simferopol, 95007, Ukraine

Some features of callus- and morphogenesis processes at *Onobrychis pallasii* were detected. The structures of the nutritious media for obtaining new plants from isolated germs, and also induction and durablis subcultivating of callus were optimized. Optimal soil for adaptation of obtained plants from the conditions in vitro to the conditions in vivo was founded.

Вступ

Найважливішою проблемою сучасності, прямо пов'язаною з проблемою виживання людства, є збереження біотичної різноманітності на нашій планеті. Сьогодні на Кримському півострові, унаслідок величезного антропогенного впливу, спостерігаються найвищі в Україні темпи генетичної ерозії. Незважаючи на певні заходи, за останні десятиліття флора Криму втратила 31, а за іншими оцінками – 39 видів, причому 21 з них доведеться викреслити і з флори України [2]. В умовах наростаючого антропогенного впливу найчутливішими до нього стають реліктові ендемічні й рідкісні види, що зумовлено їх еколого-біологічними й ценотичними особливостями [4]. Наукова й практична цінність реліктових та ендемічних рослин визначається тим, що багато з них є носіями давніх генетичних комбінацій, тобто становлять найцінніший генофонд української флори. Релікти й ендеміки – це свого роду акумулятори різноманітної біогеографічної інформації. Але багато представників цієї групи видів уже приречені й можуть зовсім зникнути, якщо не забезпечити термінових заходів щодо їх охорони й відновлення. У Конвенції про біорізноманіття, прийнятій на Міжнародній конференції з питань навколишнього середовища й розвитку в у Ріо-де-Жанейро 1992 року, а також в інших документах і наукових публікаціях розроблена стратегія охорони різноманіття біоти [2]. З метою відновлення втраченого біорізноманіття необхідно, по-перше, розробити наукову програму заходів, орієнтовану на відновлення корінних угруповань. По-друге, здійснити спеціальні роботи з реставрації природних угруповань, що знаходяться в най-

критичнішому стані (наприклад, степи). По-третє, провести спеціальні дослідження можливості реінтродукції зниклих з території області видів живих організмів; створити на базі провідних природоохоронних і наукових організацій центр реінтродукції рідкісних видів. По-четверте, забезпечити систему біотехнологічних заходів щодо відтворення умов існування зниклих і зникаючих видів флори й фауни на антропогеннопоруйованих територіях.

Починаючи від 2000 року в Біотехнологічному центрі Таврійського національного університету ім. В.І.Вернадського (м. Сімферополь) ведуться дослідження в цьому напрямку. Залучення сучасних біотехнологічних методів, таких, як клональне мікророзмноження рослин, дозволяє отримати велику кількість оздоровленого посадкового матеріалу рідкісних ендемічних рослин флори Криму й репатріювати їх у природні місця існування [1]. Одним з об'єктів досліджень став унікальний рідкісний вид родини *Fabaceae*, релікт третинного періоду – *Onobrychis pallasii* (Willd.) Vieb. У Червоній книзі України *O. pallasii* зарахований до 2-ої категорії рідкісності. Популяції цього виду нечисленні, невеликі за площею. Місцезнаходження його часто страждають через господарську діяльність людини, рослина потребує реальних заходів охорони, тому постає питання про необхідність розробки нових ефективних заходів щодо його розмноження з метою збереження генофонду виду [4]. Багато авторів рекомендують *O. pallasii* для введення в культуру. Він має декоративні властивості: гарні кремові квітки, оригінальну форму, й міг би використовуватися для озеленення міст і паркових зон не тільки Південного берегу Криму, але й для міст передгірської частини Криму, таких як Бахчисарай і Сімферополь, що, також, сприяло б збереженню виду й збільшенню чисельності його популяцій.

Мета роботи полягала в розробці прийомів культивування ізольованих тканин і органів *O. pallasii* на штучних живильних середовищах *in vitro*, у зв'язку з розв'язанням проблеми розмноження і збереження цього виду. Завданням дослідження також було відпрацювання умов культивування ізольованих зародків, калусних культур і рослин регенерантів.

Матеріали та методика

Для дотримання умов асептики роботи з уведення експлантів в ізольовану культуру проводили в умовах ламінарного бокса БП-4-005. Насіння *O. pallasii* промивали в мильній воді протягом 5-10 хв, потім поверхово стерилізували 70 і 96% етанолом. Пагони *O. pallasii* стерилізували 100% розчином препарату «Брадофен» протягом 10 хв. Після поверхневої стерилізації рослинний матеріал промивали тричі дистильованою водою.

Зародки й сегменти вегетативних органів експлантували на поверхню агаризованих модифікованих живильних середовищ Мурасіге-Скуга та Уайта. Як культуральні посудини використовували хімічні пробірки з об'ємом живильного середовища 10 мл. Культуральні посудини поміщали в умови термостатованого приміщення з температурою 26-28⁰С, відносною вологістю повітря 60-70% й освітленістю 3-5 тисяч люкс. У процесі культивування експлантів проводили візуальні дослідження, оцінку життєздатності, частоти калусоутворення і морфогенезу.

Для мікроскопічних досліджень рослинний матеріал фіксували за Карнуа, морфологію клітин досліджували на давлених препаратах, пофарбованих

метиловим-синім. Препарати укладали в гліцерин і досліджували під інтерференційно-поляризаційним мікроскопом МРІ-5 за звичайного освітлення і в режимі інтерференційного контрасту.

Результати досліджень

Перед введенням у культуру *in vitro* ізольованих зародків *O. pallasii* проводили візуальний аналіз якісного стану насіння. Було встановлено, що плоди *O. pallasii* щорічно сильно уражуються шкідниками (до 85-90% від загальної кількості насіння). Найбільшого збитку завдає зернівка еспарцетна (*Bruchidius olivaceus* Germ., *Bruchidae*). Також були проведені експерименти з оцінки енергії проростання і схожості насіння *O. pallasii*. Вона виявилася невисокою – не більш 10-15%. Цей факт дозволяє дійти висновку, що реальна схожість насіння *O. pallasii* становить не більш 1,5-2%. Дослідження, проведені в 2001-2003 рр., показали, що для рослин природних популяцій *O. pallasii* характерна висока насіннева продуктивність (до 2000 насінин на одну рослину). Це може свідчити про те, що насіннева продуктивність цього виду не лімітована ембріологічними факторами й недостатністю запилювачів. Однак, потенційну здатність до проростання за оптимальних зовнішніх умов (вологість і температурний режим) має тільки 15-20 насінин з однієї рослини. Таким чином, фактична насіннева продуктивність *O. pallasii* у природних фітоценозах не може гарантувати поновлення популяції. Це зумовлює необхідність розробки нетрадиційних методів розмноження цього виду, що можуть базуватися на вирощуванні ізольованих зародків і соматичних тканин в умовах контрольованого експерименту *in vitro*.

Культивування ізольованих зародків проводили на безгормональних і модифікованих живильних середовищах Уайта й Мурасіге-Скуга. Кращі результати були отримані на безгормональних середовищах (95-100% від висаджених на живильне середовище зародків розвивалися в нормальні рослини). Додавання до живильного середовища 2,4-Д, 6-БАП та ІУК у різних концентраціях призводило до сильного вкорочення головного кореня, уповільнення розвитку й тератологічних змін тканин проростка. Для оцінки ефективності розробленого методу розмноження *O. pallasii* з використанням ембріокультури був проведений контрольний експеримент визначення схожості насіння і характеру розвитку проростків з морфологічно нормальних зародків *in vivo*. Ці дослідження показали, що використання техніки *in vitro* дозволяє в 5-6 разів збільшити вихід рослин і в 2-3 рази зменшити час перебігу основних етапів морфогенезу.

Рослини, отримані в результаті культивування ізольованих зародків, виймали з культуральних посудин, відмивали кореневу систему від залишків агаризованого живильного середовища й переносили в субстрат. У нашому експерименті з адаптації рослин, отриманих в умовах *in vitro*, до звичайних умов використовували 4 типи субстратів. Найоптимальнішою виявилася суміш перліту з торфом і садовою землею з мергелем. Тут приживлюваність сіяньців становила понад 90%. У перші 3-4 тижні культивування рослинам створювали умови підвищеної вологості, а потім переводили на режим звичайного поливання.

Для одержання калусної культури *O. pallasii* як ініціальні експланти використовували сегменти листків, стебла, кореня а також точки росту 5-7 денних проростків, отриманих у культурі ізольованих зародків. Експланти культи-

ували на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга, доповненому 1,0 мг/л 6-БАП і 0,5 мг/л ІУК. Утворення калусу спостерігали на 6-7 день культивування в усіх варіантах досліду (табл.).

Таблиця.

**Індукція калусоутворення на модифікованому середовищі МС
(1,0 мг/л 6-БАП і 0,5 мг/л ІУК)**

| Первинний експлант | Число експлантів (шт.) | | Колір калуса | Щільність калуса |
|--------------------|------------------------|-----------------|----------------|------------------|
| | загалом | калусоутворюючі | | |
| Фрагменти стебла | 30 | 25 | світло-бежевий | щільний |
| Листок | 30 | 27 | зелений | пухкий |
| Корінь | 20 | 18 | білий | пухкий |
| Точки росту | 30 | 28 | світло-зелений | щільний |

Необхідним етапом під час розробки методів культивування клітинних культур *in vitro* є оптимізація складу живильного середовища, яке б забезпечувало добрий приріст калуса в подальшому вирощуванні тканини в пересадній культурі. Максимальний приріст калуса забезпечувало середовище Мурасіге-Скуга, доповнене 1 мг/л 6-БАП і 2 мг/л 2,4-Д. Під час подальшого субкультивування калусних культур на цьому середовищі забезпечувався гарний, стабільний приріст біомаси протягом декількох місяців.

Під час одержання калусної культури й відпрацювання умов індукції морфогенезу спостерігали утворення калуса двох типів. Перший тип зараховували до калусу морфогенного типу. Цей калус мав жовто-зелене забарвлення, вирізнявся високою інтенсивністю росту, щільною консистенцією, з розташованими на поверхні глобулярними структурами темно-зеленого кольору. Цитологічні дослідження виявили на поверхні калуса соматичні ембріоїди й закладання бруньок і меристемних осередків. Індукцію морфогенезу іноді спостерігали вже в первинному калусі. При цьому на його поверхні формувалися зародкові мікропагони, що не розвивалися під час подальшого культивування. Калус другого типу – неморфогенний, відрізнявся пухкою консистенцією, відсутністю хлорофілоносних ділянок, невисокою інтенсивністю наростання, у ньому не спостерігали ознак індукції морфогенезу.

З метою стимуляції пагоноутворення морфогенний калус переносили на живильне середовище Мурасіге-Скуга, доповнене 2,0 мг/л 6-БАП. На цьому живильному середовищі відбувалося подальше наростання калуса й розвиток мікропагонів.

Під час розмноження рослин у спосіб калусної культури завжди існує імовірність одержання форм не ідентичних вихідному генотипу в результаті генетичної нестабільності калусних клітин. У зв'язку з цим, у ході подальших досліджень передбачається цитогенетичний і ПЦР-аналіз отриманих рослин-регенерантів для встановлення їхньої подібності до рослин-донорів. Разом з тим, генетично стабільні калусні культури для деяких видів відомі, що не виключає можливість мікророзмноження *O. pallasii* на основі індукції морфогенезу в культурі калусних тканин.

Висновки

У результаті проведених досліджень виявлені деякі особливості процесів калусо- і морфогенезу в *O. pallasii*. Оптимізовано склад живильних середовищ для одержання сянців з ізолюваних зародків, а також індукції і тривалого субкультивування калуса. Підібрано оптимальні субстрати для адаптації рослин, отриманих в умовах *in vitro* до умов *in vivo*. Створено колекцію тканин зникаючого ендемічного виду кримської флори *O. pallasii* в ізолюваній культурі.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Бутенко Р.Г.** Биология клетки высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. **Вопросы развития Крыма.** Научно-практический дискуссионно-аналитический сборник, выпуск 13. Материалы к Красной книге Крыма. – Симферополь: «Таврия-плюс», 1999. – С. 8-9.
3. **Ена А.В.** Созологическая квалификация эндемиков флоры Крыма // Тематический сборник научных работ «Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана». – Симферополь, 2002. – С. 10.
4. **Редкие и исчезающие** растения и животные Украины: Справочник / В.И.Чопик, Н.Н.Щербак, Т.Б.Ардамацкая и др.; – К.: Наук. думка, 1988. – 256 с.