

УДК 582.521.42: 582.394

МОРФОГЕНЕТИЧНА ЗДАТНІСТЬ *IN VITRO* ВИДІВ РОДУ *CENTAUREA KLEOR* (ВОЛОШКА) ФЛОРИ УКРАЇНИ

А. В. ГОЛУБЕНКО, В. І. ДІДЕНКО, А. В. ЗІНЧЕНКО, О. В. ВОЙЦЕХІВСЬКА, Н. Ю. ТАРАН

Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Україна, 03022, м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2
e-mail: holubenko@yahoo.com

Мета. Метою роботи було введення в асептичну культуру двох ендемічних і одного поширеного видів роду *Centaurea* (*C. brevisceps*, *C. steveniana* і *C. stoebe*) та виявлення їхньої здатності до різних типів морфогенезу. **Методи.** У роботі застосовано методи культури рослинних тканин і клітин *in vitro*. Первинним культивульним матеріалом було насіння й частини отриманих із нього проростків. Живильне середовище Мурасіге-Скуга було використане як базове. Насіння пророщували за методиками М. Г. Ніколаєвої та власними їх модифікаціями. **Результати.** Отримали проростки *C. brevisceps*, *C. steveniana* і *C. stoebe*. Рослини *C. brevisceps* виявили здатність до вегетативного розмноження *in vitro* шляхом живцювання та до формування неморфогенного калюсу. Експланти *C. steveniana* утворювали морфогенний калюс і вегетативні та генеративні пагони-регенеранти з нього, а також були здатні до прямої регенерації пагонів (мікроклонування) на сегментах стебла. *C. stoebe* не утворювала адвентивних бруньок на стеблових експлантах, проте виявила здатності до масової регенерації на листкових і черешкових експлантах. **Висновки.** Морфогенез різних видів *Centaurea in vitro* має як видову, так і тканинну специфіку, та залежить від експланта. Досліджувані види здатні до таких типів морфогенезу: калюсогенез, пряма й непряма регенерація адвентивних бруньок і пагонів з них, утворення генеративних пагонів.

Ключові слова. *Centaurea*, рідкісні ендемічні рослини, морфогенез *in vitro*.

Вступ. Глобальні зміни клімату і зростання антропогенного тиску (руйнування природних ареалів, забруднення навколишнього середовища, масове винищення рослин тощо) є основними причинами збіднення фіторізноманіття [1, 2]. Дедалі більше видів рослин потрапляють під загрозу знищення та набувають статусу рідкісних і зникаючих. Особливо вразливими є рослини-ендеміки, які обмежені вузьким природним ареалом і є досить вразливими до змін у природному середовищі. Створення природоохоронних резерватів для збереження рідкісних рослин *in situ* не завжди ефективно для ендемічних рослин. Згідно з основними положеннями Конвенції про збереження біорізноманіття, прийнятною альтернативою консервативним способам збереження фіторізноманіття є вирощування їх *ex situ*, за умов інтродукції у ботанічні сади та культивування в культурі *in vitro* [1, 3].

Для успішного інтродукційного процесу, зазвичай, як вихідний батьківський садивний матеріал, використовують насіння або живці. Проте, якщо кількість і життєздатність рослинного матеріалу обмежена, а вилучати з природи рідкісні рослини заборонено, інтродукція значно ускладнюється. Також, за таких умов, стає практично неможливим вивчення фізіологічних, біохімічних та генетичних особливостей цих рослин. У цьому випадку має значні переваги введення рослин в культуру *in vitro*, яка дає можливість навіть з невеликої кількості батьківського матеріалу отримати велику кількість генетично ідентичних рослин за короткий проміжок часу. Крім того, розмножені й вирощені в асептичній культурі рослини можуть стати об'єктом різноманітних досліджень з метою з'ясування їхніх біологічних властивостей та використання як корисних (наприклад, лікарських, декоративних, кормових тощо) рослин [4, 5, 6].

Флора України налічує вісімнадцять рідкісних і зникаючих видів роду *Centaurea Kleor* (Волошка), занесених до Червоної Книги України, серед яких є і ендемічні види, природні місця зростання яких часто знаходяться під загрозою зникнення [7]. Поряд із виявленням наявності цих ендемів на територіях описаних ареалів є також необхідність встановлення філогенетичних зв'язків між ними, дослідження їхнього походження на цих територіях та динаміки їхнього поширення чи, навпаки, зникнення.

Експедиційне вивчення ареалів рідкісних видів волошок показало, що самовідтворення видів відбувається повільно, матеріалу для молекулярних, цитогенетичних, і фізіологічних досліджень недостатньо, а отримане насіння із гербарних зборів попередніх років має надзвичайно низьку схожість. Отримання рослин для збереження в умовах інтродукції виявилось неможливим, проте наявність невеликої кількості насіння деяких видів волошок (рідкісних — *Centaurea breviceps Iljin* (*C. margaritacea Ten. subsp. breviceps (Iljin) Dostál*) — Волошка короткогорова, *C. steveniana Klokov* (*C. ovina Pall. ex Willd. subsp. steveniana*) — Волошка Стевена, а також широко поширеної *C. stoebe L.*) дала змогу використати його як первинний матеріал для введення в культуру *in vitro* з метою подальших молекулярно-генетичних досліджень, які необхідні для остаточного з'ясування таксономічного статусу (статусу окремого виду чи підвиду) ендемічних волошок з точки зору їхньої філогенії [8].

Поряд із введенням у асептичну культуру двох видів рідкісних ендемічних видів волошок доцільним було також вивчення морфогенезу *in vitro* рослин більш поширеного виду *C. stoebe*, який став інвазійним у Північній Америці та активно досліджувався при розробці алелопатичної теорії інвазійності рослин [9], для можливого використання його як модельного об'єкта для відпрацювання методики культивування представників роду *Centaurea* в асептичній культурі.

Отже, метою нашої роботи було ввести рослини трьох видів роду *Centaurea* в стерильну культуру та ініціювати у них всі можливі типи морфогенезу *in vitro* для визначення їхньої морфогенетичної здатності. Для досягнення мети було поставлено такі завдання: 1) отримати первинний культивативний матеріал — асептичні проростки; 2) підібрати живильні середовища для

ініціації різних типів морфогенезу *in vitro* (калюсогенез, регенерація вегетативних бруньок і пагонів з них, коренів, генеративних органів).

Матеріали і методи

Для введення волошок у стерильну культуру використовували насіння *C. breviceps*, *C. steveniana* і *C. stoebe*, надане співробітниками кафедри Ботаніки ННЦ «Інститут біології» КНУ імені Тараса Шевченка, яке було зібране впродовж експедиційних поїздок. Рослинний матеріал для досліджень було вилучено з гербарію і надано у вигляді висушених суцвіть, після препарування яких було відібрано виповнені насінини. Повноцінного насіння було мало, оскільки гербарій було зібрано ще до закінчення цвітіння. Насіння пророщували *in vitro* за загальноприйнятою методикою [10] з власною модифікацією.

Поверхневу стерилізацію насіння виконували за такою схемою: насіння експонували у 70 % етанолі впродовж 60 с, потім — у 0,1 % розчині $HgCl_2$ впродовж 12 хв. Після стерилізації насіння тричі промивали стерильною дистильованою водою. Отримані з насіння асептичні проростки використовували як первинний культивативний матеріал для дослідження морфогенезу *in vitro*.

У експериментах з ініціації різних типів морфогенезу використовували живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) [11] з половинним вмістом макро- і мікроелементів (МС/2), з додаванням вітамінів (В₁, В₆, РР — 0,5 мг/л, 0,5 мг/л, 1 мг/л, відповідно), 100 мг/л мезоінозиту, 20 % сахарози, регуляторів росту з ауксиною (ІОК — індолилцтова кислота, α -НОК — нафтилоцтова кислота) та цитокініною (БАП — 6-бензиламінопурин) активністю у різних концентраціях.

Результати та обговорення

Дослідження показало здатність *C. breviceps* до нормального росту на безгормональному живильному середовищі та вегетативного розмноження шляхом живцювання. При тривалому культивуванні (протягом 4–6 місяців, за які було проведено 2–3 пасажи на свіже середовище того ж складу) некорінені живці *C. breviceps* утворювали жовтуватий неморфогенний калюс на базальній частині живця, а деякі з них сформували вегетативні і генеративні пагони з суцвіттями з пелюстками білого кольору (рис. 1).

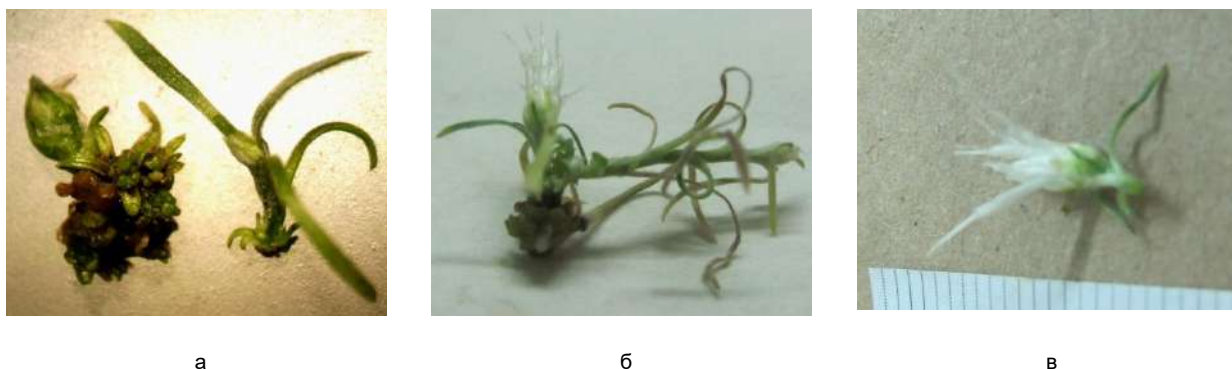


Рисунок 1. Морфогенез *in vitro* *C. breviceps*: а) регенерація пагонів; б) утворені вегетативний і генеративний пагін; в) квітка, сформована за умов асептичної культури

Додавання до живильного середовища ауксиноактивних регуляторів росту у невисоких концентраціях (0,05–0,1 мг/л) ініціювало слабкий ризогенез. Вищі концентрації ауксинів викликали проліферацію калюсу, проте калюс був неморфогенним і нежиттєздатним. Отриманий результат показав здатність *C. breviceps* до щонайменше трьох типів морфогенезу, що може бути основою для розробки модифікованої технології клонального мікророзмноження *C. breviceps*.

Рослини *C. steveniana* виявили здатність до нормальної вегетації на живильному середовищі МС/2 без додавання регуляторів росту. Спроба вегетативного розмноження шляхом звичайного мікроживцювання і укорінення мікроживців на середовищі МС/2 з додаванням 0,2 мг/л ІОК та 0,02 мг/л НОК була невдалою: очікуваної регенерації коренів не спостерігалось, натомість відбувалось формування морфогенного калюсу з подальшою спонтанною регенерацією адвентивних бруньок та мікропагонів з них, проте, отримані адвентивні пагони мали ознаки вітрифікації. Екс-

планти *C. steveniana* показали високу чутливість до впливу ауксиноактивних регуляторів росту навіть за наявності низьких концентрацій їх у складі середовища. Це може свідчити про активний синтез ендогенних ауксинів, на що варто звертати увагу під час експериментів з оптимізації живильних середовищ для ризогенезу, калюсогенезу та непрямой регенерації.

Додавання бензиламінопурину до живильного середовища (МС/2, доповнене 1 мг/л БАП, 0,2 мг/л ІОК та 0,1 мг/л НОК) ініціювало пряму регенерацію пагонів (мікроклонів) *C. steveniana* на сегментах стебла — спостерігалось формування мікрокущів із 3–7 повноцінних мікроклонів, які було відокремлено від материнської розетки й висаджено на середовище МС/2, доповнене 0,1 мг/л НОК, для укорінення (рис. 2). Проте, як і у мікроживців, так і у мікроклонів, ризогенезу ініціювати не вдалося. Лише після тривалого культивування на безгормональному живильному середовищі з'явилися ознаки формування коренів.

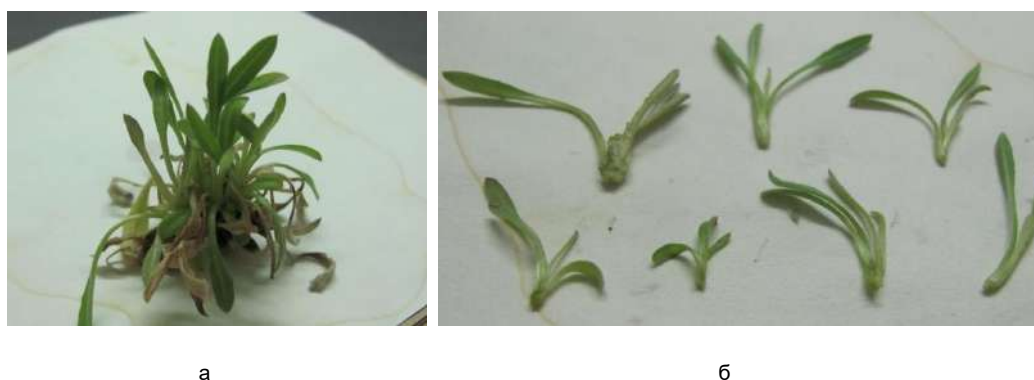


Рисунок 2. Морфогенез *in vitro* *C. steveniana*: а) мікрокущ; б) відокремлені мікроклони

Вегетативне розмноження живцюванням *C. stoebe* виявилось неможливим, оскільки проростки формували дуже коротке стебло із надто щільною розеткою листків. Тому, експлантами для дослідження морфогенезу цього виду були листки та черешки. Низькі концентрації регуляторів росту у живильному середовищі не викликали морфогенної реакції, але за культивування на

живильному середовищі МС/2, доповненому 5 мг/л БАП + 0,25 мг/л ІОК, на базальному й дистальному кінцях листків утворився морфогенний калюс, з якого регенерували адвентивні бруньки та пагони з них, при чому інтенсивність регенерації мікроклонів на черешкових експлантах, у порівнянні з листовими, була значно вищою (рис. 3).

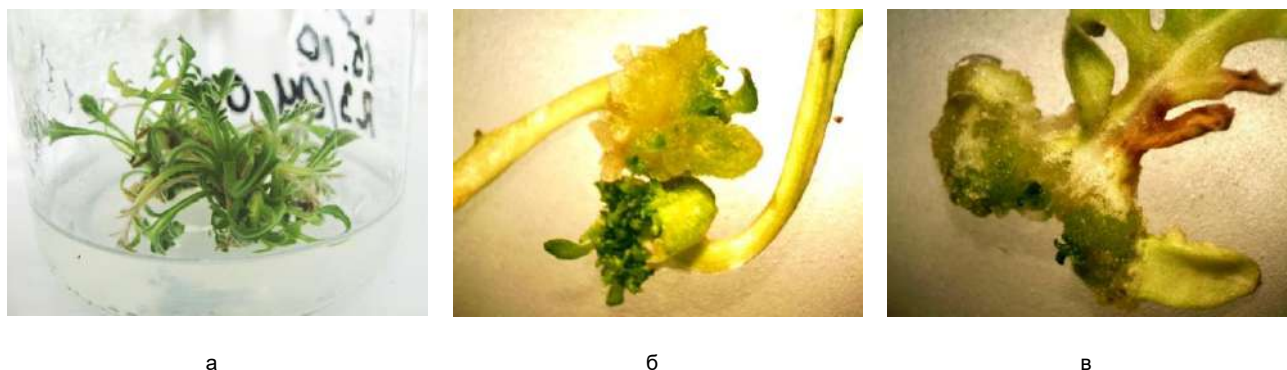


Рисунок 3. Морфогенез *in vitro* *C. stoebe*: а) мікрокущ; б) регенерація на черешкових експлантах; в) регенерація на листовому експланті

Висновки

Встановлено, що всі досліджувані види *Centaurea* здатні до спонтанного морфогенезу *in vitro* на живильному середовищі без додавання регуляторів росту та виявляють видоспецифічну реакцію на вміст регуляторів росту в ньому. За умови обмеженої кількості експлантів *Centaurea*, нами було отримано три типи морфогенезу: калюсогенез, пряма й непряма регенерація адвентивних бруньок і пагонів з них, утворення генеративних пагонів. Виявлено, що морфогенетична здатність рослин *C. steveniana* вища, ніж *C. breviceps* та *C. stoebe*. Отриманий культивувальний матеріал використано для подальших цитогенетичних і молекулярно-генетичних досліджень.

Перелік літератури

1. Конвенція про біологічне різноманіття: громадська обізнаність і участь. — К. : Інтерекоцентр. — 1997. — 153 с.
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. Малишева Н. Р., Олещенко В. І., Кузнєцова С. В. та ін. Правові засади впровадження в Україні Конвенції про біорізноманіття. — К. : Хімджест. — 2003. — 176 с.
4. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К. : Логос, 2005. — 730 с.

5. *In vitro* manipulation and propagation of *Gentiana* L. species from the Ukrainian Flora / N. M. Drobyk, L. R. Hrytsak, V. M. Melnyk, N. V. Kravets, I. I. Konvalyuk, M. O. Twardovska, V. A. Kunakh // The Gentianaceae. — Vol. 2: Biotechnology and applications by the edit. J. J. Rybczynski, M. R. Davey, A. Mikula. — Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015. — P. 45–79.
6. Parnikozka I. et al. Comparative analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. population adaptability in the natural environment of the Admiralty Bay region (King George Island, maritime Antarctic) // I. Parnikozka, N. Miryuta, I. Ozheredova, I. Kozeretska, J. Smykla, V. Kunakh, P. Convey / Polar Biology. — 2015. 38 (9): 1401–1411.
7. Червона книга України. Рослинний світ / За ред. Я. П. Дідуха. — К. : Глобалконсалтинг. — 2009. — С. 298–315.
8. Moysiyyenko I. I., Tarieiev A. S., Didenko V. I., Karpenko N. I., Kostikov I. Yu. *Centaurea breviceps* Iljin (Asteraceae, Magnoliophyta): neotype and its annotation according to ITS1 and ITS2 secondary structures // Chornomors'k. bot. z., 2014. — 10 (3): P. 276–286. doi:10.14255/2308-9628/14.103/1
9. Мосякін А. С. Огляд основних гіпотез інвазійності рослин // Укр. ботан. журн., 2009. — Т. 66, № 4. — С. 466–476.
10. Николаева М. Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян / М. Г. Николаева, М. В. Разумова, В. Н. Гладкова — Л. : Наука. — 1985. — 347 с.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid grows bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. — 1962. — № 57. — P. 473–497.

Представлено О. О. Пороннік
Надійшла 15.05.2017

**MORPHOGENETIC ABILITY *IN VITRO*
OF THE GENUS CENTAUREA KLEOP SPECIES
OF UKRAINIAN FLORA**

A. V. Golubenko, V. I. Didenko, A. V. Zinchenko,
O. V. Voytsekhivska, N. Yu. Taran

Educational and Scientific Centre
«Institute of Biology and Medicine» Taras Shevchenko
National University of Kyiv
Ukraine, 03022, Kyiv, Akademika Glushkova Avenue, 2
e-mail: holubenko@yahoo.com

Aim. The purpose of the work was to introduce into the aseptic culture two endemic and one common species of the *Centaurea* genus (*C. breviceps*, *C. steveniana* and *C. stoebe*) and to identify their ability to different types of morphogenesis. **Methods.** The methods of plant tissue and cell culture *in vitro* are used in this work. Seeds and parts of the seedlings derived from seeds were primary cultivating material. The nutritional medium of Murashige-Skoog was used as a base. The seeds were sprouted

according to Nikolaeva's methods and their own modifications. **Results.** Seedlings *C. breviceps*, *C. steveniana* and *C. stoebe* were obtained. Ability to vegetative reproduction *in vitro* by cutting and forming non-morphogenic callus of *C. breviceps* plants have been shown. *C. steveniana* explants formed morphogenic callus and vegetative and generative shoots-regenerants from it, as well as they were able to the shoot direct regeneration (microcloning) from the segments of the stem. *C. stoebe* did not form the adventitious buds on stem explants, but revealed the ability to mass regeneration from leafy and petiolate explants. **Conclusions.** Morphogenesis *in vitro* of the various species of *Centaurea* genus have both type and tissue specificity, and depends on explants. The investigated species are able to the following types of morphogenesis: forming of callus, direct and indirect regeneration of adventitious buds and shoots from them, forming of generative shoots.

Keywords: *Centaurea*, rare endemic plants, *in vitro* morphogenesis.