

Особливості динаміки початкових етапів онтогенетичного розвитку *Calycanthus floridus* L. *in vitro*

Лариса А. Колдар

Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України, м. Умань

e-mail: koldar55@ukr.net, ORCID ID 0000-0002-6756-4172

Реферат.

Мета. Дослідження динаміки індивідуального росту і розвитку рослин *in vitro* на ранніх етапах онтогенезу та з'ясування змін, що відбуваються в експлантів за дії фітогормонів у різні вікові періоди, визначено метою наших досліджень. **Методи.** Роботу виконували в лабораторії мікроклонального розмноження рослин Національного дендропарку «Софіївка» Національної академії наук України. Дослідження вікових станів рослин *Calycanthus floridus* L. проводили на рослинах, отриманих з насіння пророщеного на модифікованих агаризованих живильних середовищах за прописом Мурасіге і Скуга (МС). Для визначення ефективності росту і розвитку експлантів у різні вікові періоди використовували живильні середовища модифіковані додаванням фітогормонів: 6-бензиламинопурину (6-БАП) — 0,1–1,0 мг/л, індолилмасляної кислоти (β -ІМК) — 0,01–0,20 мг/л та цистеїну — 0,5–1,5 мг/л. **Результати.** Отримані в ході експерименту дані засвідчили, що *in vitro* ріст експлантів *C. floridus* складається з декількох послідовних вікових етапів, у проходженні яких реалізується як спадкова інформація організму (генотип), так і формується фенотип — сукупність усіх ознак і властивостей рослини, які значною мірою залежали від вмісту та концентрацій фітогормонів у живильних середовищах. У ході експерименту в експлантів *C. floridus*, культивованих на живильних середовищах за прописами Мурасіге і Скуга (МС), модифікованих додаванням 6-БАП 0,5 мг/л, β -ІМК 0,08 мг/л та 1,0 мг/л цистеїну, виявлено найбільш активну зміну моментів формування морфологічних структур та настання початкових стадій онтогенезу. **Висновки.** Культивовані *in vitro* експланти *C. floridus*, одержані від сівби насіння на живильні середовища, проходили латентний період росту і п'ять вікових станів: зародковий (*se*), проростків (*pl*), ювенільний (*j*), іматурний (*im*) та віргінільний (*v*). Формування морфологічних структур найбільш активно відбувалося на живильному середовищі модифікованому додаванням 6-БАП 0,5 мг/л, β -ІМК 0,08 мг/л та цистеїну 1,0 мг/л.

Ключові слова: рід *Calycanthus* L., *in vitro*, онтогенез, живильні середовища, фітогормони, періоди росту.

Features of the dynamics of the initial stages of ontogenetic development *Calycanthus floridus* L. *in vitro*

Larysa A. Koldar

National dendrological park «Sofyivka» of NAS of Ukraine, Uman, Ukraine,

e-mail: koldar55@ukr.net, ORCID ID 0000-0002-6756-4172

Abstract.

Aims. Studying the dynamics of individual growth and development of plants *in vitro*, in the early stages of ontogeny, to find out the changes that occur in explants under the action of phytohormones at different ages is the aim of our research. **Methods.** The work was performed in the laboratory of microclonal propagation of plants of the National Dendropark «Sofiyivka» of the National Academy of Sciences of Ukraine. The study of age states of *Calycanthus floridus* L. plants was carried out by germination of seeds on agarized, nutrient media according to Murashige and Skoog (MS) prescription. To determine the efficiency of growth and development of explants at different ages, nutrient media modified by the addition of phytohormones were used: 6-benzylaminopurine (6-BAP) — 0.1–1.0 mg/l, indole butyric acid (β -IBA) — 0.01–0.20 mg/l and cysteine — 0.5–1.5 mg/l. **Results.** The data obtained during the experiment showed that the growth of explants of *C. floridus in vitro* consists of several successive age stages, during the passage of which both hereditary information of the organism (genotype) and phenotype are realized — a set of all signs and properties of the plant, which largely depended on the content and concentrations of phytohormones in the nutrient media. In explants of *C. floridus*, cultured on Murashige and Skoog (MS) nutrient media, modified by the addition of 6-BAP 0.5 mg/l, β -IBA 0.08 mg/l, and 1.0 mg/l cysteine, revealed an active change in the formation of morphological structures and the onset of the initial stages of ontogenesis. **Conclusions.** *In vitro* cultured explants of *C. floridus*, obtained from sowing seeds on nutrient media, underwent a latent period of growth and five age states: embryonic (*se*), seedling (*pl*), juvenile (*j*), immature (*im*), and virgin (*v*). The formation of morphological structures was most active on the nutrient medium modified by the addition of 6-BAP 0.5 mg/l, β -IBA 0.08 mg/l, and cysteine 1.0 mg/l.

Key words: genus *Calycanthus* L., *in vitro*, ontogeny, nutrient media, phytohormones, growth periods.

Вступ/Introduction. Раціональне використання рослинних ресурсів Землі, збереження генофонду ендеміків та рослин-інтродуцентів з властивими їм продуктивністю, декоративністю, умовами екологічного росту є актуальною проблемою сьогодення. Велике як теоретичне, так і прикладне значення для розв'язання даної проблеми мають дослідження онтогенетичного розвитку культивованих декоративних деревних рослин. Вивчення основних періодів формування у них морфологічних структур, сприятиме збереженню рослинного різноманіття і розробленню оптимальних технологій їх розмноження й вирощування. Біологія індивідуального розвитку певною мірою є джерелом

знань про закономірності розвитку рослинних об'єктів в онтогенезі (Kutsenko et al., 2014). Основою збереження біорізноманіття рослин і джерелом збільшення асортименту видів з цінними господарськими ознаками є інтродукція нових видів і їх розмноження. Значна кількість рослин, на якій базується сьогодні зелене будівництво, є переважно інтродуцентами. Тому актуальним є пошук нових високодекоративних рослин здатних конкурувати з аборигенними культурами або й значно переважати їх за стійкістю та господарськими показниками. До таких рослин належать види роду *Calycanthus* L., з родини Калікантові (*Calycanthaceae* Lindl.). Ареал роду охоплює Тихоокеанське й Атлантичне узбережжя США із незначним просуванням у глибину країни й займає Південний Схід (два визнані види: *C. brockianus* Ferry & Ferry f. й *C. floridus* L. та *C. fertilis* Walt., вид, котрий нині вважається синонімом різновиду *C. floridus* var. *glaucus* (Willd.) Torr. & A.Gray), а також Захід Північної Америки (*C. occidentalis* Hook. & Arn.). Єдиним видом, що походить з Південно-Східного Китаю є *C. chinensis* (W.C.Cheng & S.Y.Chang) W.C.Cheng & S.Y.Chang ex P.T.Li, який відрізняється тривалим періодом цвітіння, швидкістю росту, широкою екологічною амплітудою та довговічністю.

Рослини видів роду *Calycanthus* є джерелом цінного декоративного матеріалу для використання в зеленому будівництві (Oleshko & Navtyliuk, 2011; Koldar, 2015). Крім цього вони придатні для контейнерного вирощування, а зрізані квітучі пагони для створення рослинних композицій. Поширення вони набувають і в медичній практиці де використовуються корені, кора, листки, квітки, насіння, а ефірні олії — в парфумерії (Moerman, 1998; Zhang & Liu, 1998).

Відмінною особливістю рослин цього роду є насичений запах камфори, інколи він схожий на фруктовий або медовий, який видають усі частини чагарнику, більшою мірою — квітки, меншою — листки, стебла й коріння. У сухоцвітів цей запах зберігається впродовж декількох років.

Впровадження в озеленення і широке використання калікантів у зеленому будівництві, як цінних у декоративному відношенні рослин-інтродуцентів, обмежено відсутністю садивного матеріалу. Масове їх вирощування та впровадження у виробництво потребує вдосконалення методів розмноження (Oleshko, 2013).

Важливою складовою, в процесі інтродукції рослин, є дослідження закономірностей їх індивідуального росту й розвитку в конкретних умовах (зокрема розмноження *in vitro*) та з'ясування змін, які відбуваються в експлантів за дії фітогормонів у різні вікові періоди. Це потребує розділення онтогенезу на періоди, які якісно різними етапами, що базуються на послідовній реалізації в часі різноманітних порцій генетичної інформації, на поступовому поетапному розгортанні спадкової інформації програми розвитку. Кожний із послідовних періодів онтогенезу має специфічні фізіологічні властивості та морфологічні ознаки. Він об'єднує як утворення і ріст нових

структур, так і фізіологічні зміни, що зумовлюють їх виникнення ще в кінці попереднього періоду (Demarco, 2020; Figura & Ponert, 2019; Gnativ, 2014).

За розмноження рослин *in vitro*, одними з основних препаратів які застосовуються з метою пришвидшення та покращення росту рослин у певні періоди їх культивування є регулятори росту. Саме тому дослідження екзогенної дії цих препаратів на ранні етапи онтогенезу рослин є особливо актуальним. Тому мета нашої роботи полягала в дослідженні особливостей динаміки початкових етапів онтогенетичного розвитку експлантів *Calycanthus floridus* L. *in vitro* за дії регуляторів росту.

Матеріали і методи/Materials and Methodology. Розмноження рослин *C. floridus in vitro* та дослідження зміни вікових періодів у експлантів проводили методом пророщування насіння на агаризованих, живильних середовищах за прописом Мурасіге і Скуга (Murashige & Skoog, 1962), модифікованих додаванням фітогормонів: 6-бензиламинопурину (6-БАП) — 0,1–1,0 мг/л, індолилмасляної кислоти (β -ІМК) — 0,01–0,20 мг/л та цистеїну — 0,5–1,5 мг/л.

Періоди індивідуального розвитку та віковий стан експлантів визначали за методикою Тихона Работнова (Rabotnov, 1950), деталізованою Олексієм Урановим (Uranov, 1975). Деконтамінацію насіння проводили промиванням його дезінфекційним засобом «Септодор» виробництва ТОВ ВІК-А (м. Київ, Україна), з подальшою обробкою 0,1 % розчином дихлориду ртуті (HgCl_2). Повторність дослідів триразова. Фіксування головних моментів формування морфологічних структур проводили за результатами систематичних спостережень за ростом і розвитком рослин. Дослідження виконували в лабораторії мікроклонального розмноження рослин Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України.

Результати та обговорення/Results and Discussion. Онтогенетичний розвиток рослинного організму складається з послідовних вікових етапів в основу яких закладено якісні та кількісні морфологічні показники. У ході росту й розвитку рослин реалізується спадкова інформація організму (генотип) у конкретних умовах середовища, в результаті чого формується фенотип — сукупність усіх ознак і властивостей індивідуального організму (Tikhankov, 2009; Sulusoglu Durul & Memis, 2022). Усі зміни в будові та життєдіяльності рослин відбуваються завдяки низці взаємопов'язаних морфологічних, анатомічних, біохімічних, фізіологічних змін. Рослина росте завдяки засвоєнню живильних речовин і енергії з навколишнього середовища, а в процесі онтогенезу проходить реалізація спадкових властивостей організму закладених на генетичному рівні (Tikhankov, 2009; Rusman et al., 2020).

Індивідуальний розвиток рослин *C. floridus* починався з латентного періоду (*se*), коли насіння, маючи в собі зародок і живильний матеріал для нього (ендосперм), перебували в стані спокою та мали гетеротрофне живлення (рис. 1а). Проте, за розмноження *in vitro*, у насіння, висіяного на живильні середовища з різним вмістом регуляторів росту та вологістю до 80%, впродовж 28 ± 3 діб відбувався перехід до стану проростків (*g*). Поглинання насінням із

живильного середовища вологи та фітогормонів (зокрема ауксинів і цитокінінів, які регулюють ріст зародка) слугувало пусковим фактором проростання, яке відбувалося в результаті збільшення проникності насінної оболонки для води й внаслідок тиску від набухання насінини, що й спричинювало розрив її оболонки (рис. 1б). Впродовж наступних чотирьох діб від переходу до стану проростків спостерігали ріст розтягуванням самого чохлакоподібного зародкового корінця, в результаті чого кінчик кореня виштовхувався із насінини (рис. 1в). Вихід кореня забезпечував закріплення пророслої насінини в агаризованому живильному середовищі та покращував поглинання вологи.

Через три доби, вслід за коренем, починався ріст пагону який подовжувався завдяки розтягуванню гіпокотилу (рис. 1г). Проростаючи в темряві, і корінь, і пагін свій ріст орієнтували перш за все за гравітаційним вектором. За період гетеротрофного росту, в процесі проростання насіння, нами виділено такі фази розвитку як набухання, наکیلчування, гетеротрофний ріст зародкового кореня та проростка пагона (рис. 1), що свідчило про завершення одного з вікових станів рослин — стану проростків (*pl*) який тривав близько 35 ± 2 діб від сівби насіння на живильні середовища.

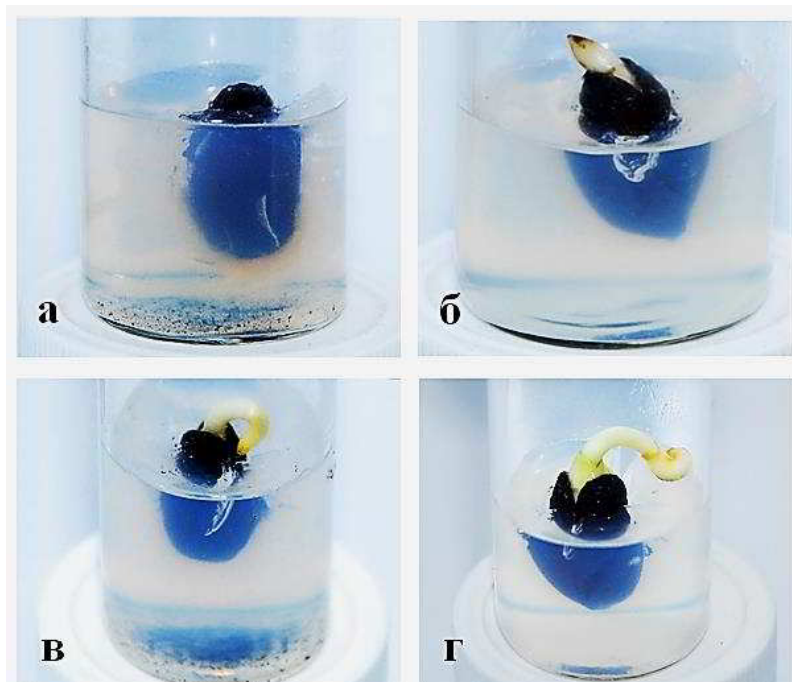


Рисунок 1. Початкові етапи онтогенезу у *C. floridus in vitro*
а — насінина введена *in vitro*, б — розрив насінного покриву
гетеротрофний ріст: в — кореня, г — пагона

Figure 1. Initial stages of ontogenesis in *C. floridus in vitro*
а—seed introduced *in vitro*; б—rupture of the seed coat
heterotrophic growth: в—root, г—shoot

Цей період гетеротрофного живлення принципово відрізнявся від автотрофного тим, що в цей час рослинний організм існував за рахунок готових органічних сполук, а енергію, необхідну для засвоєння та перетворення цих речовин, він отримував унаслідок окислення частини цих же самих органічних сполук.

Подальші процеси індивідуального розвитку *C. floridus* проявлялися у збільшенні об'єму і маси експлантів, що забезпечувалося і регулювалося фітогормонами (табл. 1).

Таблиця. 1. Залежність початкових етапів онтогенезу у *C. floridus* від гормонального складу живильних середовищ
Table 1. Dependence of the initial stages of ontogenesis in *C. floridus* on the hormonal composition of nutrient media

Варіант/Variant	Регулятори росту/ Growth regulators			Початок стадій онтогенезу за гетеротрофного живлення рослин (діб від дати сівби насіння) Beginning of ontogenesis stages in heterotrophic nutrition of plants (days from the moment of sowing seeds)			
	6-БАП/ 6-BAP	β-ІМК β-IBA	цистеїн cysteine	набухання насіння swelling seeds	розрив насінного покриву testa rupture	проростання корінця radicle growth	ріст пагону shoot growth
I	0,1	0,01	0,5	36±3	38±3	41±1	39±2
II	0,3	0,05	0,8	30±2	33±1	34±2	37±2
III	0,5	0,08	1,0	28±3	29±2	32±3	35±3
IV	0,8	0,10	1,2	29±4	25±4	35±4	38±2
V	1,0	0,20	1,5	39±2	33±2	39±2	44±2

Інтенсивність, активність та тривалість проходження початкових стадій онтогенезу перебували в залежності від вмісту у живильних середовищах ріст-регулюючих речовин та їх концентрацій. За вмісту у живильному середовищі 6-БАП 0,5 мг/л, β-ІМК 0,08 мг/л та 1,0 мг/л цистеїну (варіант III) процеси набухання насіння, ріст кореня та пагону відбувалися в найкоротші строки (28±3, 32±3 та 35±3 діб) від початку сівби. Дещо довшими періодами до початку даних стадій та їх тривалістю ці ж показники відрізнялись у варіантах II та IV за вмісту 6-БАП до 0,3 та 0,8 мг/л, β-ІМК до 0,05 та 0,1 мг/л і цистеїну до 0,8 та 1,2 мг/л, а збільшення концентрацій 6-БАП до 1,0 мг/л, β-ІМК до 0,2 мг/л і цистеїну до 1,5 мг/л та зменшення 6-БАП до 0,1 мг/л, β-ІМК до

0,01 мг/л та до 0,5 мг/л цистеїну істотно гальмували настання онтогенетичних стадій у експлантів.

За умов *in vitro* перехід до наступної ювенільної (j) стадії розвитку відбувався впродовж наступних шести діб після стану проростків (pl), з появою досить великих виїмчастих сім'ядольних листків (рис. 2) які впродовж 12–16 діб досягали досить великих розмірів (1,6×1,4 см) з одночасним наростанням кореня. У даний діапазон часу в експлантів відбувався перехід до активного засвоєння із живильних середовищ необхідних метаболітів, що сприяло активному наростанню вегетативних органів.

Впродовж усього періоду росту й розвитку рослин проводили спостереження та реєстрацію видимих змін в експлантів за дії різних концентрацій фітогормонів на їх ростову активність. У культивованих культуральних рослин формувалася їх проста організація, при якій зберігалася первинна структура пагону і кореня, але відбувалась втрата зв'язку із насінною. Початок онтогенетичних стадій у експлантів та подальший ріст і розвиток рослин перебували в прямій залежності від складу живильних середовищ та концентрацій у них гормонів цитокінінового й ауксинового типу дії.

Таблиця 2. Залежність онтогенетичних стадій у *C. floridus* від гормонального складу живильних середовищ

Table 2. Dependence of ontogenetic stages in *C. floridus* on hormonal composition of nutrient media

Варіант/Variant	Регулятори росту/ Growth regulators			Початок онтогенетичних стадій за автотрофного живлення рослин (діб від початку сівби насіння) The beginning of ontogenetic stages under autotrophic plant nutrition (days from the moment of sowing seeds)		
	6-БАП/6-BAP	β-ІМК/β- IBA	цистеїн/cysteine	поява сім'ядольних листків/ the cotyledon leaves appear	поява першої пари справжніх листків/ the first pair of true leaves appear	ріст віргінільних рослин/ growth of virgin plants
I	0,1	0,01	0,5	39±1	44±3	56±2
II	0,3	0,05	0,8	26±3	35±2	45±1
III	0,5	0,08	1,0	31±3	33±2	39±3
IV	0,8	0,10	1,2	27±2	36±4	43±2
V	1,0	0,20	1,5	31±4	39±3	49±4

Перехід до автотрофного живлення під дією фітогормонів сприяв активному росту експлантів та формуванню новоутворень (сім'ядольних та справжніх листків) з подальшим ростом пагонів. Найкоротшим періодом часу до початку свого формування відрізнялись експланти, які росли на живильному середовищі модифікованому додаванням 6-БАП 0,5 мг/л, β -ІМК 0,08 мг/л та цистеїну 1,0 мг/л, на якому появу сім'ядольних листків спостерігали на 31 ± 3 добу від сівби насіння, появу першої пари справжніх листків — на 33 ± 2 добу, а формування віргінільної рослини відбувалося на 39 ± 3 добу від початку введення насіння на живильні середовища.

Протягом наступних 14 ± 3 діб за подальших морфологічних змін, які проходили у пагоновій та кореневій системах (видовження та потовщення пагону й кореня, утворення першої пари справжніх зі збереженням сім'ядольних листків) відбувався перехід до іматурного (*im*) вікового стану (рис. 2).



Рисунок 2. Формування та ріст першої пари справжніх листків у *C. floridus* (ювенільна стадія розвитку)

Figure 2. Formation and growth of the first pair of true leaves in *C. floridus* (juvenile stage of development)

Впродовж наступних 27 ± 4 діб за дії регуляторів росту відбувався подальший ріст рослин, який проявлявся у кількісному збільшенні рослини завдяки формуванню другої та третьої пари листків (рис. 3).



Рисунок 3. Формування та ріст віргінільної рослини *C. floridus*

Figure 3. Formation and growth of virgin plant *C. floridus*

Тут добре простежувалося явище компетенції, тобто готовності рослини специфічно реагувати на різні концентрації фітогормонів ауксинового та цитокінінового типу та цистеїну. На даному етапі розвитку проявлялися ознаки переходу рослинних особин від ювенільних до дорослих і формування віргінільних (v) рослин.

Надалі відбувалося продовження росту головного, бокових та додаткових коренів, потовщення центрального пагону та формування й ріст бічних. До кінця ювенільного періоду формувалися рослини, з-поміж яких за результатами візуального оцінювання відбирали матеріал для подальшого мікроклонального розмноження.

Висновки/Conclusions.

Культивовані *in vitro* експланти *Calycanthus floridus* L., одержані від сівки насіння на живильні середовища, проходили латентний період росту і п'ять вікових станів: зародковий (se), проростків (pl), ювенільний (j), іматурний (im) та віргінільний (v). Формування морфологічних структур найбільш активно відбувалося на живильному середовищі модифікованому додаванням 6-БАП 0,5 мг/л, β -ІМК 0,08 мг/л та цистеїну 1,0 мг/л. Добре сформовані пробіркові рослини використовувалися за джерело експлантів для подальшого розмноження *in vitro*.

Список посилань/References

Kutsenko, O. M., Bilyk, V. V., & Kutsenko, N. I. (2014). Osoblyvosti ontogenezu tsmynu piskovoho pry kultyvuvanni. *Ontogenez — stan, problemy ta perspektyvy vyvchennia roslyn v kulturnykh ta pryrodnykh tsenozakh: mater. mizhnar. nauk. konf. prysviachenoї 135-richchiu zasnuvannia Khersonskoho derzhavnoho ahrarnoho un-tu. Kherson. TOV «Ailant»*. S. 66–73. (in Ukrainian).

Oleshko, V. V., & Havryliuk, O. S. (2011). Introduktsiia vydiv rodu *Kalycanthus* (Calycanthus L.) ta perspektyvy vprovadzhennia ikh v ozelenennia. *Naukovyy visnyk VNI im. Lesi Ukrainky*. No 19. S. 30–33. (in Ukrainian).

Koldar, L. A. (2015). Perspektyvy vykorystannia vydiv rodu *Calycanthus* L. u zelenomu budivnytstvi Pravoberezhnoho Lisostepu Ukrainy. *Materialy mizhnarodnoi naukovoї konferentsii «Aktualni problemy sadovo-parkovoho mystetstva»*. Uman: VPTs «Vizavi», S. 93–95. (in Ukrainian).

Moerman, D. E. (1998). *Native American Ethnobotany*. Publisher: timber Press, Incorporated. 927 p.

Zhang, R. H., & Liu, H. E. (1998). *Wax shrubs in World (Calycanthaceae)*. Beijing: China & Technology Press. P. 130–166.

Oleshko, V. (2013). Reproduction species of the genus sweetshrub (*Calycanthus* L.) green cuttings in Volyn forest steppe of Ukraine. *Scientific journal “Biological Systems: Theory and Innovation”*. Biology, Biotechnology, Ecology. No. 193. P. 1–4. URL: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/article/view/4846/4777>.

Gnativ, P. S. (2014). *Functional diagnostic of dendroecology*: Scientific monograph. Lviv: Prospect “Kamula”. 333 p. (in Ukrainian).

Figura, T., Tylová, E., Šoch, J., Selosse, M. A., & Ponert, J. (2019). *In vitro* axenic germination and cultivation of mixotrophic *Pyroloideae* (*Ericaceae*) and their post-germination ontogenetic development. *Annals of Botany*. Vol. 123. No 4. P. 625–639. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcy195>.

Demarco, D. (2020). *Plant ontogeny: Studies, analyses, evolutionary, implications*. Hauppauge: Nova Science Publishers. 291 p.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. Vol. 15. No 3. P. 473–497.

Rabotnov, T. A. (1950). Zhiznennyi tsikl travianistyykh mnogoletnikh rasteniy v lugovykh tsenozakh. *Trudy botanicheskogo instituta im. V. L. Komarova AN SSSR. Seriya 3 (Geobotanika)*. No 6. S. 7–204. (in Russian).

Uranov, A. A. (1975). Vozrastnoy spektr fitotsenopopuliatsiy kak funktsiya vremeni i energeticheskikh volnovykh protsessov. *Nauchnye doklady vysshey shkoly. Biologicheskie nauki*. No 2. S. 7–34. (in Russian).

Tikhankov, I. O. (2009). Some aspects of the growth and morphogenesis regulation of grassy plants. *Scientific Bulletin of the Uzhhorod University. Series Biology*. No. 26. P. 154–164. (in Ukrainian).

Sulusoglu Durul, M., & Memis, S. (2022). Optimization of conditions for *in vitro* culture of selected *Arbutus unedo* L. genotypes. *Agronomy*. Vol. 12. No 3. P. 623 (1–16). DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy12030623>.

Rusman, Q., Lucas-Barbosa, D., Hassan, K., & Poelman, E. H. (2020). Plant ontogeny determines strength and associated plant fitness consequences of plant-mediated interactions between herbivores and flower visitors. *Journal of Ecology*. Vol. 108. No. 3. P. 1046–1060. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13370>.