

- Pullman G.S., Johnson S.S., Van Tassel, Zang Y. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MeS pH buffer, biotin and folic acid // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2005. – 80. – P. 91–103.
- Bonga J.M., Klimaszewska K.K., von Anderkas P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2010. – 100. – P. 241–254.
- MakKay J.J., Becwar M.R., Park Y-S., Corderro J.P., Pullman G.S. Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implication for breeding // Tree Genetic and genomics. – 2006. – 2. – P. 1–9.

LUKINA A.V.¹, TRETYAKOVA I.N.²

¹ Regional Centre for young naturalists,

Russia, 660100, Krasnoyarsk, Kirenskogo str., 23, email: yunnatu@gmail.com

² V.N. Sukachev Institute of Forest,

Russia, 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50, email: culture@ksk.krasn.ru

FACTORS OF INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *PINUS SIBIRICA* DU TOUR

Aims. *In vitro* clonal propagation has the potential for fast multiplication of superior genotypes, allowing the exploitation of maximum genetic gain achieved in the breeding program. To determine the proportion of immature zygotic embryos from each open pollinated (OP) and controlled pollinated (CP) family from which somatic embryogenesis could be initiated and the number of responding families using various initiation media. **Methods.** For initiation of embryogenic cultures five media differs of plant grow regulator and carbohydrates source and concentration were tested. 22 OP and 6 CP trees have been used as zygotic embryo donors. **Results.** All tested media were capable to support proliferation cells lines *P. sibirica*. Callus tissue was initiated on explants from all of the 22 trees tested. Great variation in the mean percentage of embryogenic line establishment was observed, depending on the family.

Key words: somatic embryogenesis, *Pinus sibirica*, plant grow regulator, family effect.

УДК 58.086+581.522.4

МАРТИНЮК В.О.¹, ГОЛУБЕНКО А.В.¹, ГУМЕНЮК Г.Б.²

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка ННЦ «Інститут біології», Україна, 01032, м. Київ, вул. Симона Петлюри, 1, holubenko@yahoo.com

² Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, e-mail: shumlyany@list.ru

УВЕДЕННЯ В АСЕПТИЧНУ КУЛЬТУРУ РІДКІСНОЇ ЕНДЕМІЧНОЇ РОСЛИНИ *ATOCION LITHUANICUM* (ZAPAL.) TZVEL.

Atocion lithuanicum (Zapal.) Tzvel. (до 2001 р. – *Silene lithuanica* Zapal.) [1] – сарматський, здебільшого поліський ендемік [2], занесений до Червоної книги України, хоча природоохоронний статус виду все ще залишається неоціненим [3]. Ареал виду охоплює Польщу, Литву, Україну та Білорусь, в Україні цей вид зустрічається лише на Поліссі, переважно Правобережному на своїй східній та південній межі поширення [3–5]. Зростає на освітлених ділянках із сухими, бідними, піщаними ґрунтами в соснових лісах по галявинах і узліссях, біля доріг, часто на протипожежних смугах [3, 4, 6]. Основними причинами змін чисельності є зривання рослин, витоптування та заліснення [3]. *A. lithuanicum* має протиерозійне (закріплення пісків) та

декоративне значення, рослини іноді висаджують на присадибних ділянках [3, 7].

Зважаючи на соцологічний статус *A. lithuanicum*, необхідно застосувати всі можливі заходи для збереження генофонду виду як у природі, так і *ex situ*. Метою нашої роботи було введення рослин *A. lithuanicum* в асептичну культуру для вивчення їх морфогенетичних особливостей та збереження у складі колекції рідкісних рослин *in vitro* Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Матеріали і методи

Для отримання первинних експлантів – асептичних проростків *A. lithuanicum* – було використане зріле насіння, зібране з рослин, яке зростало на території загальновійськового

полігону А4152 (Рівненська область). Стерилізацію насіння проводили у такій послідовності: 70 %-й етиловий спирт – 1 хв., 0,1 %-й розчин HgCl₂ – 8–12 хв., трикратне промивання дистильованою водою. Простерилізоване насіння висівали на агаризоване безгормональне живильне середовище МС (Мурасіге-Скуга) [8] з розведеним удвічі вмістом мікро- і мікроелементів (МС/2). Насіння *A. lithuanicum* пророщували за власною модифікацією загальноприйнятих методик [9], заклавши 5 варіантів досліду у 5-ти повторностях кожного: у темряві при 24 °С; з холодовою стратифікацією (7 днів при 5 °С); при обробці розчином гіберелової кислоти (ГК₃) у концентрації 100 мг/л протягом 20 год.; на світлі з чергуванням температури 24 °С (7 днів) з наступним витриманням за температури 5 °С (14 днів) та при 24 °С на світлі (контроль). Отримані проростки *A. lithuanicum* культивували *in vitro* за освітленості 3000–5000 лк, 16-годинного фотоперіоду, температури 24 °С, відносної вологості повітря 70 % на агаризованих живильних середовищах МС/2 з додаванням ауксин- та цитокінінактивних регуляторів росту в різних поєднаннях концентрацій [10]. Результати оброблено статистично [11].

Результати та обговорення

Пророщування насіння та отримання асептичних проростків, як первинних експлантів, було єдиним доступним для нас способом введення *A. lithuanicum* в культуру *in vitro*. Даних щодо спокою і проростання насіння досліджуваного виду нами знайдено не було, тому ми застосували комплексний підхід до вирішення цього питання. Спостереження за проростанням насіння *A. lithuanicum* показали, що проростання починається вже на п'ятий день після висіву. Таким чином з'ясувалось, що виконання одного з 5-ти способів пророщування насіння, у якому теплова стадія повинна була передувати холодовій, виявилось недоцільним, а його результати були враховані нами як додатковий контроль.

Як видно з таблиці, найвищі показники проростання насіння *A. lithuanicum in vitro* були отримані при пророщуванні його без додаткових умов на світлі за температури 24 °С (контроль). Найгірше проростання спостерігалось в темряві та після витримання насіння на холоді. Отримані результати свідчать про відсутність у насіння *A. lithuanicum* стану спокою та позитивний вплив світла на проростання. Проростки за морфологічними характеристиками також відрізнялись у різних варіантах досліду.

Таблиця. Схожість насіння *A. lithuanicum in vitro* за різних умов пророщування

№	Варіант досліду	Загальна кількість насінин, шт.	Кількість проростків у повторності, шт.	Загальна кількість проростків, шт.	Середня схожість насіння, %
1.	Контроль	500	31	152	30,4±0,07
			37		
			24		
			32		
			28		
2.	Обробка ГК ₃ (100 мг/л) протягом 20 год.	250	11	65	26,0±0,25
			11		
			17		
			14		
			12		
3.	Темрява	250	9	47	18,8±0,27
			13		
			4		
			8		
			13		
4.	Холодова стратифікація (7 діб)	250	8	58	23,2±0,26
			12		
			14		
			9		
			15		

Так, при пророщуванні у темряві, розвиток їх був нерівномірним, формувались як дрібні, так і надмірно видовжені проростки, чого не було у контрольному та решті варіантів (рис. 1). Обробка гібереловою кислотою дещо стимулювала видовження гіпокотила і гальмувала розвиток кореня. Холодова стратифікація сповільнювала розвиток проростків на початкових етапах проростання, проте за 7–10 днів він встановлювався на рівні контролю.

Отримані проростки використовувались як первинні експланти для дослідження морфогенетичних реакцій *A. lithuanicum in vitro*. У ході експерименту були протестовані живильні середовища з різними концентраціями ауксинів – індолилоцтової та нафтилоцтової

кислот (ІОК і НОК), і двох цитокінінів – кінетину та 6-бензиламінопурину (БАП), а також середовище МС/2 без регуляторів росту.

На безгормональному середовищі МС/2 можна було спостерігати активну вегетацію рослин *A. lithuanicum*, спонтанне утворення, активний ріст і галуження коренів (рис. 2). У переважній більшості випадків пагони формувались як щільні розетки. Утворення адвентивних бруньок і пагонів не спостерігалось. Незважаючи на активний ріст, забезпечити вегетативне розмноження *A. lithuanicum* на середовищі без регуляторів росту виявилось неможливим. Проте такий субстрат може бути придатним для підготовки до переведення вирощених *in vitro* рослин до септичних умов.

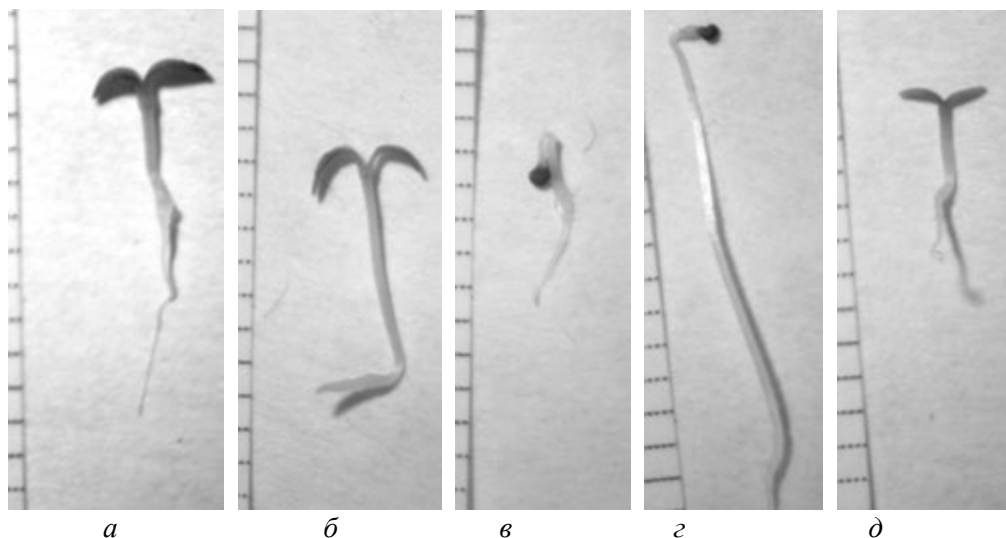


Рис. 1. Розвиток проростків *A. lithuanicum* на 10-ту добу від початку проростання: *a* – контроль; *б* – передпосівна обробка ГК₃; *в*, *г* – пророщування в темряві; *д* – холодова стратифікація (1 поділка лінійки дорівнює 1 мм)



Рис. 2. Ріст рослин *A. lithuanicum* на безгормональному середовищі МС/2

Результати наших досліджень показали високу чутливість експлантів досліджуваних рослин до наявності регуляторів росту в живильних середовищах. На середовищі 1 мг/л БАП у поєднанні з 0,2 мг/л ІОК та 0,1 мг/л НОК спостерігалось активне утворення калусу та фасційованих спотворених пагонів (рис. 3). При заміні бензиламінопурину на кінетин (2 мг/л) кількість фасціацій була значно нижчою, але поява адвентивних бруньок і пагонів (мікроклонів) також супроводжувалась калусогенезом.

Низькі концентрації як цитокінінів, так і ауксинів у живильному середовищі сприяли утворенню адвентивних бруньок і пагонів з них. Найбільш придатним для мікроклонального розмноження *A. lithuanicum* виявилось

середовище МС/2, доповнене 0,2 мг/л кінетину, 0,1 мг/л ІОК та 4 мг/л аденіну, при культивуванні на якому частота регенерації становила 100 %, а на кожен експлант припадало 3–5 мікроклонів (рис. 4).

Отже, в результаті виконаної роботи, ми досягли поставленої мети – вивчивши фізіологічні особливості проростання насіння, отримали первинні експланти та ввели в асептичну культуру рослини *A. lithuanicum*, підібрали оптимальний склад живильних середовищ для вегетації та мікроклонального розмноження і включили досліджуваний вид до складу колекції рідкісних рослин *in vitro* Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка.



Рис. 3. Утворення калусу, фасційованих пагонів та нормальних мікроклонів *A. lithuanicum* на живильному середовищі МС/2 з додаванням 1 мг/л БАП



Рис. 4. Мікроклонування *A. lithuanicum* на живильному середовищі МС/2 з додаванням 0,2 мг/л кінетину, 0,1 мг/л ІОК та 4 мг/л аденіну

Висновки

При введенні рослин *A. lithuanicum* культуру *in vitro* виявлено, що насіння виду не має стану спокою, а його проростання відбувається за участі світла. Встановлено високу морфогенетичну здатність рослин *A. lithuanicum* та чутливість до наявності в

живильному середовищі цитокинін- і ауксин активних фітогормонів. На основі отриманих результатів можна проводити подальшу оптимізацію складу живильних середовищ для мікроклонального розмноження досліджуваних рослин.

Література

1. Цвелев Н.Н. О родах трибы Смолевковых (Sileneae DC., Caryophyllaceae) в Восточной Европе // Новости систематики высших растений. – 2001. – 33. – С. 90–113.
2. Федорончук М.М. *Silene* L. sensu lato в Україні: огляд роду *Silene sensu stricto* (Caryophyllaceae) // Укр. ботан. журн. – 1997. – 54, № 6. – С. 557–564.
3. Червона книга України. Рослинний світ / за ред. Дідуха Я.П. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
4. Флора УРСР/ Під ред. Котова М.І. – К: Вид-во АН УРСР, 1952. – 4 – 689 с.
5. Определитель высших растений Украины / под ред. Прокудина Ю.Н. и др. – Киев: Наукова думка, 1987. – 548 с.
6. Флора Восточной Европы./ Под ред. Цвелева Н.Н. – Москва – Санкт-Петербург: Товарищество научных изданий КМК, 2004. – 11. – 536 с.
7. Екофлора України. Федорончук М.М., Дідух Я.П. та ін. / Відпов. ред. Дідух Я.П. – К.: Фітосоціоцентр, 2002. – Т. III. – 496 с.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. plant.* – 1962. – 15. – P. 473–497.
9. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 347 с.
10. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наукова думка, 2005. – 272 с.
11. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б.А. Доспехов. – М.: Колос. – 1985. – 336 с.

MARTYNIUK V.O.¹, GOLUBENKO A.V.¹, HUMENYUK H.B.²

¹ 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

² Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University,

Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonis str., 2, e-mail: shumlyany@list.ru

INITIATION TO ASEPTIC CULTURE OF RARE ENDEMIC PLANT *ATOCION LITHUANICUM* (ZAPAL.) TZVEL.

Aims. Introduction of the rare endemic species *Atocion lithuanicum* (Zapal.) Tzvel. to *in vitro* culture for its preservation *ex situ*. Research of the seed germination, *in vitro* vegetation, microclonal reproduction features and morphogenetic potential of *A. lithuanicum* plants. **Methods.** *A. lithuanicum* seeds were germinated *in vitro* using our own modification of the traditional methods. Explants of aseptic seedlings were cultivated on a ½ Murashige & Skoog basal medium with different hormonal composition. **Results.** It was discovered that *A. lithuanicum* seeds germinate in the light at 24°C. It was found that adding low concentrations of kinetine and indole acetic acid to the medium stimulates the microclone formation. **Conclusions.** The *A. lithuanicum* seeds have no dormancy state. The *A. lithuanicum* plants show a high ability for morphogenesis *in vitro*. The reproduction of *A. lithuanicum* in the aseptic culture is one of the possible ways to preserve this rare endemic species.

Key words: *Atocion lithuanicum* (Zapal.) Tzvel., seed germination, *in vitro* culture, clonal micropropagation.