

М. В. Небиков, І. В. Чіков
Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України

ПОЧАТКОВІ ЕТАПИ ВВЕДЕННЯ *PONTEDERIA CORDATA* VAR. *LANCEOLATA* (NUTT.) GRISEB. В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Наведено результати досліджень з підбору експозиції для проведення ефективної стерилізації розчином 2,5% гіпохлориту натрію та живильних середовищ при введенні експлантів *Pontederia cordata* L. var. *lanceolata* (Nutt.) Griseb. у культуру *in vitro*.

Вступ

Прибережно-водні рослини значно підвищують естетичні якості і санітарно-гігієнічне значення водойм [5]. Особливою декоративністю відзначаються тропічні і субтропічні гігро- та гідрофіти.

Однією з таких прибережно-водних рослин, які б могли стати справжньою окрасою як ботанічних садів і дендропарків, так і приватних садиб громадян є *Pontederia cordata* L. var. *lanceolata* (Nutt.) Griseb. Вона має дуже гарні синьо-фіолетові суцвіття та ефектне блискуче листя і квітує пізніше багатьох інших прибережних рослин.

P. cordata var. *lanceolata* (синонім *P. lanceolata* Nutt.) — гідрофіт, багаторічна рослина, ареал поширення знаходиться в південно-східній частині США, часто розглядається як більш південний різновид *P. cordata* L. Росте на мілководдях по берегах річок, озер, ставків. Рослини великі з симподіальним стеблом та з м'ясистими кореневищами, що симподіально галузяться. Довгі повзучі кореневища мають пучки тонких додаткових коренів, що відходять від кожного вузла. Кущ розлогий, заввишки 80–120 см. Листки на стеблах з суцвіттями за розміром найбільші — 21,0×9,5 см. Квітуча частина синьо-жовтого суцвіття розміром 8,0×3,5 см, більш щільна та яскрава ніж у *P. cordata*. Період цвітіння триває з кінця травня до середини вересня. Плід однонасінний, горіхоподібний. Розмножується живцюванням та плодами. Зимує як в оранжереї, так і у відкритому ґрунті під накриттям

з сухого листя та є перспективною для озеленення прибережної зони декоративних водойм глибиною 5–40 см (оптимальна 10–15 см) [11].

P. cordata var. *lanceolata* досить рідко трапляється у садових центрах та розсадниках [9, 10]. Зважаючи на те, що при вегетативному розмноженні з однорічного куща *P. cordata* var. *lanceolata*, за нашими даними, можна отримати лише біля 10 повноцінних саджанців, а насіннева продуктивність — на 70% нижча, ніж у *P. cordata* L., то для більш ефективного розмноження та забезпечення попиту громадян вважаємо доцільним розробити методику розмноження *P. cordata* var. *lanceolata* в умовах *in vitro*, що може значно збільшити коефіцієнт розмноження даної рослини.

Отже, метою нашої роботи є з'ясування можливості мікроклонального розмноження *P. cordata* var. *lanceolata*, підбір оптимальних варіантів стерилізації рослинного матеріалу, живильних середовищ для введення його у культуру *in vitro* з подальшим розмноженням експлантів та отримання морфологічно вирівняного садивного матеріалу.

Матеріали та методи досліджень

Рослини *P. cordata* var. *lanceolata* інтродуковані в 2010 р. у НДП «Софіївка» НАН України з Арборетуму Болестрашице (Польща). В умовах парку росте на інтродукційній ділянці ім. В. В. Мігіна та в оранжереї.

Дослідження виконано в лабораторії мікроклонального розмноження Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України.

Як первинні експланти використовували проростки

(1–2 см) зі сплячими бруньками, які взяли з кореневища рослини (Рис. 1). У кожному варіанті досліджували по 10 експлантів у трьохразовому повторенні.

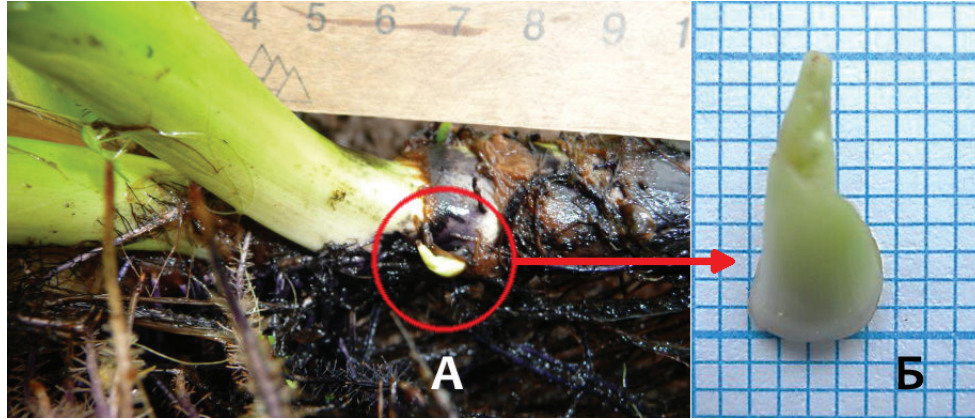


Рис. 1. Відбір експлантів з *P. cordata* var. *lanceolata* для стерильної культури (А – материнська рослина, Б – експлант).

Базовим живильним середовищем слугувало середовище за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [9], з додаванням сахарози 30 г/л, агар-агару 7 г/л. рН середовища становила 5,6–5,8.

При введенні в культуру *in vitro* для знищення патогенної мікрофлори на поверхні експлантів було випробувано водний розчин 2,5% гіпохлориту натрію (NaOCl) з різними експозиціями [3, 7, 8]. З метою покращення ефективності стерилізуючого реагенту до розчину додавали емульгатор «Твін 80». Після стерилізації експланти тричі промивали дистильованою водою впродовж 10–15 хв. та висаджували на безгормональне середовище МС. Ефективність стерилізації оцінювали на 8 добу після введення у культуру *in vitro*, визначаючи співвідношення стерильних експлантів до їх загальної кількості. Життєздатність експлантів визначали на 14 добу після введення в культуру, співвідношенням життєздатних експлантів до їх загальної кількості. Живильні середовища, матеріали, інструменти та посуд готували згідно загальноприйнятих методик [1, 2, 4]. Культивування експлантів проводили у культуральній кімнаті за температури 25 ± 1 °С, 16-годинному фотоперіоді, штучному освітленні 3–5 тис. люкс та відносній вологості повітря 70–75%.

Результати досліджень та їх обговорення

Одним з важливих факторів при введенні у культуру є стерилізація рослинного матеріалу, оскільки всі органи рослин пронизані спорами грибів і бактерій. У деяких рослин мікроорганізми проникають глибоко у тканини і такі рослини важко піддаються стерилізації. Виходячи із вище зазначеного, режим стерилізації підбирали експериментально з дотриманням загальних правил [1] (рис. 2).

При обробці експлантів *P. cordata* var. *lanceolata* розчином гіпохлориту натрію впродовж 0,5 хв. кількість стерильних експлантів становить 42,8%, а при збільшенні дії цього чинника до 1,5–2 хв. аналогічний показник складає 93,3–96,8%, проте життєздатність різко знижується і це пов'язано збільшенням некротичних плям на експлантах.

Найбільш ефективною виявилася стерилізація водним розчином гіпохлориту натрію з експозицією одна хвилина, де кількість простерилізованих експлантів — 86,7% і вихід життєздатних — 68,4% від загальної кількості (рис. 3).

Для вивчення гормонального впливу на проліферацію мікропагонів *P. cordata* var. *lanceolata* через 10–12 діб експланти пересаджували на середовище МС, де для стимуляції пагоноутворення додавали наступні регулятори росту:

6-бензиламінопурин (6-БАП), β -індоліоцтова кислота (ІОК), α -нафтилоцтова кислота (НОК), β -індолимасляна кислота (ІМК) у різних

концентраціях. Оцінку ефективності середовищ на активізацію росту та розмноженню проводили через 20 днів після пересадки.

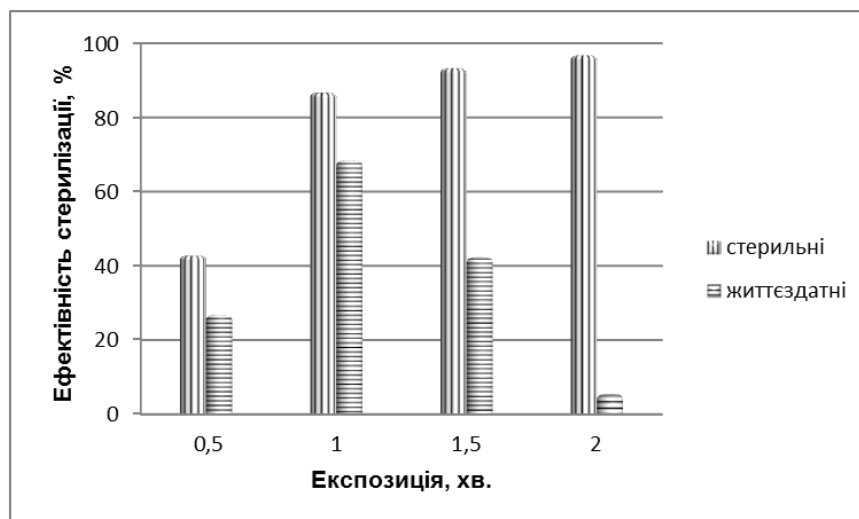


Рис. 2. Ефективність стерилізації експлантів *P. cordata* var. *lanceolata* 2,5% розчином гіпохлориту натрію (NaClO) залежно від експозиції

Вивчення здатності до морфогенезу *P. cordata* var. *lanceolata* проводилося на чотирьох варіантах живильних середовищ, відібраних експериментальним шляхом, які позитивно впливали на ріст та розмноження експлантів при попередніх дослідженнях (таб.).

Розвиток експлантів проростків (1,0–1,5 см) на

різних середовищах показав, що найкращими були середовища МС 3 та МС 4, де у експлантів розвивалися як апікальна так і базальна частини (рис. 4). На середовищах МС 19 і МС 20 відмічали на початку культивування активний розвиток експлантів, але через 15–20 днів спостерігали пригнічений ріст у них і в подальшому потемніння тканин та некроз.



Рис. 3. Експлант *P. cordata* var. *lanceolata* на 8 добу після введення в культуру *in vitro*



Рис. 4. Експлант *P. cordata* var. *lanceolata* через 14 днів росту

Середовище	Регулятори росту та їх концентрації, μM		Розвиток експлантів
	БАП	Ауксини	
МС 3	4,40	ІМК 2,46	+
МС 4	1,78	ІМК 2,46	+
МС 19	2,22	НОК 0,54	-
МС 20	0,44	ІОК 0,06	-

Примітка: (+) — спостерігали та (-) — не спостерігали активний ріст.

Дослідження органогенезу *P. cordata* var. *lanceolata* в умовах *in vitro* та методів укорінення одержаних пагонів для подальшої адаптації рослин в умовах *ex vitro* та їх вирощування у відкритому ґрунті тривають.

Таким чином, у ході досліджень, ми з'ясували можливість мікроклонального розмноження *P. cordata* var. *lanceolata*, підбрали оптимальний варіант стерилізації проростків (живців) та декілька живильних середовищ для введення їх у культуру *in vitro*. В подальшому необхідно розробити методику розмноженням експлантів та отримання

морфологічно вирівняного садивного матеріалу.

Висновки

Найбільший відсоток стерильних (86,7%) та життєздатних експлантів (68,4%) одержано при поверхневій стерилізації 2,5% водним розчином гіпохлориту натрію (NaClO) при експозиції 1,0 хв.

Для культивування *Pontederia cordata* var. *lanceolata* на початкових етапах введення в культуру *in vitro* оптимальними середовищами є середовища МС 3 та МС 4 з додаванням 1,78–4,40 μM БАП та 2,46 μM ІМК

Перелік посилань

1. *Биотехнология* растений: культура клеток / Пер. с англ. В. И. Негрука; С предисл. Р. Р. Бутенко. — М.: Агропромиздат, 1989. — 280 с.
2. *Калинин Ф. Л.* Методы культуры тканей в физиологии и биотехнологии растений. / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук — К.: Наук. думка, 1980. — 487 с.
3. *Колдар Л. А.* Розмноження *Dianthus gratianopolitanus* Vill. у культурі *in vitro*, як метод збереження генофонду рослин / Л. А. Колдар, М. В. Небиков, Н. М. Кучер // Матеріали Міжнародної наукової конференції «Рослинний світ у Червоній книзі України: впровадження глобальної стратегії збереження рослин» (м. Київ, 11–15 жовтня 2010 р.). — Київ: Альтерпрес, 2010. — С. 268–270.
4. *Кунах В. А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіологічно-біохімічні основи. / В. А. Кунах — К.: Логос, 2005. — 730 с.
5. *Манохина Р. П.* Интродукция декоративных прибрежно-водных растений в Таджикистане: автореф. дис.. канд. биол. наук. / Р. П. Манохина — Душанбе, 1984. — 21 с.
6. *Мусієнко М. М.* Фізіологія рослин: Підручник. М. М. Мусієнко — К.: Фітоцентр, 2001. — 392 с.
7. *Небиков М.* Основні етапи морфогенезу *Securigera elegans* (Pančić) Lassen у культурі *in vitro* / М. Небиков, А. Куземко // Интродукція та збереження рослинного різноманіття: Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. — 2009. — Вип. 25–27. — С. 119–121.
8. *Небыков М. В.* Особенности размножения *Hedysarum grandiflorum* Pall. в культуре *in vitro* / Небыков М. В., Колдар Л. А., Руденко Н. В. // Первые Международные научно-практические Беккеровские чтения: Сборник научных трудов по материалам конференции. — Волгоград: ТриАС, 2010. — Часть 2. — С. 141–143.

9. *Розсадник С. Семенова* [електронний ресурс]. — Режим доступа: <http://semenov-garden.acsbud.ua/press/id/48>
10. Садовий центр “Imperial garden” [електронний ресурс]. — Режим доступа: www.imperialgarden.ru
11. Чіков І. В. Колекція представників родини *Pontederiaceae* у Національному дендропарку «Софіївка» НАН України / І. В. Чіков // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології: Матеріали III Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (Донецьк, 24–27 лютого 2014 р.) — Донецьк: Вид-во «Ноулідж» (донецьке відділення), 2014. — С. 33–34.
12. *Murashige T.* A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T Murashige., F Skoog // *Physiol. Plant.* — 1962. — Vol. 15. — № 13 — P. 473–497.

М. В. Небиков, І. В. Чіков

Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України

НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ ВВЕДЕНИЯ *PONTERDERIA CORDATA* VAR. *LANCEOLATA* (NUTT.) GRISEB. В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Установлено, что наиболее эффективно стерилизация проростков *Pontederia cordata* L. var. *lanceolata* (Nutt.) Griseb. водным раствором (2,5%) гипохлорита натрия (NaClO) при введении в культуру *in vitro*, осуществляется при экспозиции 1 мин., что дает возможность получить наивысший показатель жизнеспособности при наилучшей, для данной экспозиции, эффективности стерилизации. На начальных этапах развития explantов позитивное влияние имеет добавление в питательную среду в качестве ауксинов ИМК.

M. V. Nebykov, I. V. Chikov

National Dendrology Park of “Sofyivka” NAS of Ukraine

THE INTRODUCTION OF EXPLANTS *PONTERDERIA CORDATA* VAR. *LANCEOLATA* (NUTT.) GRISEB. FOR INITIATION IN VITRO CULTURE

In the researches it is established that the effective sterilizer for initiation *in vitro* culture of *Pontederia cordata* L. var. *lanceolata* (Nutt.) Griseb. is 2.5% sodium hypochloride (NaOCl) with 1 min. exposition. This sterilizer makes it possible to get the highest viability index with the best sterilization efficiency for this exposition. Hormonal structure of mediums for activation morphogenic processes have been carried out.