

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

## НАСІННЕВЕ РОЗМНОЖЕННЯ *PULSATILLA PRATENSIS* (L.) MILL. В УМОВАХ *IN VITRO*

Описано насінневий спосіб розмноження рослин *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill в умовах *in vitro*. Досліджено схожість та проростання насіння в умовах лабораторії та *in vitro*, відпрацьовано режим стерилізації, гормональний склад середовища для активації морфогенних процесів.

### Вступ

Збереження біорізноманіття рослин є однією з найбільш актуальних проблем сучасності. Підтримання генетичного різноманіття рідкісних та зникаючих видів рослин здійснюється шляхом збереження цілісності екосистем у природних місцезростаннях (*in situ*) і значно доповнюється технологіями збереження рослин в умовах культури в ботанічних садах та дендропарках (*ex situ*) [2].

До видів, які знаходяться під загрозою зникнення належить *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill. — представник родини *Ranunculaceae* Juss. Природний ареал виду охоплює Балкани, Середню та Східну Європу. В Україні вид поширений у лісовій, лісостеповій та степовій зонах. Основними причинами зменшення чисельності виду є терасування схилів при лісорозведенні, розорювання лучних степів, випасання, зривання квітів на букети, випалювання травостою, витоштування. *P. pratensis* — багаторічна трав'яниста рослина 10–40 см заввишки з товстим кореневищем і прямостоячим густо-м'яковолосистим, напіврозетковим стеблом. Листки тричі-п'ячаторозсічені, опушені, прикореневі — довгочерешкові. Квітка поникла, вузька дзвоникоподібна, 2–4 см в діаметрі, з 6 яйцеподібними або широко-яйцеподібними, темно-фіолетовими, ззовні пухнастими листочками оцвіттини. Цвіте у квітні-травні, плодоносить у червні [11].

Рослини *P. pratensis* здавна використовують як у народній медицині для лікування нервових захворювань, хвороб нирок, сечовивідних шляхів, порушеннях обміну речовин, органів зору [1, 3],

так і у декоративному садівництві для озеленення кам'янистих гірок, рокаріїв, міксбордерів, бордюрів [6, 8]. Тому питання забезпечення садивним матеріалом *P. pratensis*, запаси якого у природній флорі обмежені, є актуальним.

В останні десятиліття при вирішенні проблеми збереження генофонду рослин успішно використовуються методи біотехнології рослин, зокрема мікроклональне розмноження, що базується на тотипотентності рослинної клітини, тобто здатності рослини до вегетативної регенерації з соматичних клітин. Застосування методів розмноження *in vitro* дає можливість швидкого розмноження рідкісних та зникаючих видів у ботанічних садах і дендропарках [7].

Метою нашої роботи була розробка методики масового розмноження *P. pratensis*, підбір ефективних варіантів стерилізації рослинного матеріалу та оптимальних живильних середовищ для індукції морфогенезу, а також порівняння ранніх етапів онтогенезу цього виду в умовах насінневої лабораторії та культури *in vitro*.

### Матеріали та методи досліджень

Дослідження проведені у лабораторії мікроклонального розмноження рослин Національного дендропарку «Софіївка» НАН України.

Як первинні експланти використовували насіння місцевої репродукції та проростки, отримані при пророщуванні насіння в термошафі та у чашках Петрі на вологому фільтрувальному папері за кімнатної температури. У кожному варіанті досліджували по 30 насінин з трьохкратним повторенням. Енергію

проростання та схожість визначали за загальноприйнятими методиками [9, 10].

Базовим живильним середовищем було середовище Мурасіге-Скуга (МС) [12] з додаванням сахарози 30 г/л, агар-агару 8 г/л та регуляторів росту: 6-бензиламінопурину (6-БАП) та 1-нафтилоцтової кислоти (1-НОК) в різних концентраціях.

У роботі використовували методи культури рослинних тканин та індукції морфогенних процесів *in vitro*, викликаних гормонами. Культивування експлантів проводили у культуральній кімнаті з кондиційованим повітрям при температурі  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , відносній вологості повітря 70–75%, фотоперіоді 16 годин і штучному освітленні інтенсивністю 3–5 тис. люкс. Посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища стерилізували згідно загальноприйнятих методик [4, 5]. Використання стерилізації вихідного матеріалу сприяло знищенню епіфітних мікроорганізмів та грибів. Під час підбору

оптимальних стерилізаторів використовували водні розчини різних хімічних реагентів, зокрема 3,5% гіпохлорит натрію та 1,0% нітрат срібла при різних експозиціях. Найбільший вихід стерильних та життєздатних експлантів одержано при використанні 3,5% гіпохлориту натрію для насіння при експозиції 1,5 хв. і для проростків — 3,0 хв.

#### Результати досліджень та їх обговорення

Вихідний матеріал для культури *in vitro* отримано шляхом пророщування у лабораторних умовах насіння *P. pratensis* при температурах 20 та  $25^\circ\text{C}$  (табл. 1). Тривалість проростання насіння — 30 діб. Під час пророщування у чашках Петрі на 8–10 добу від часу намочування насіння з-під насінневих покривів гіпокотилем виноситься зародковий корінець. Через 5–6 діб розвиваються сім'ядольні листки. Появу пари перших справжніх листків спостерігали на 28–30 добу.

#### 1. Лабораторна схожість насіння *P. pratensis*

Температура при пророщуванні насіння	Енергія проростання, %	Схожість, %
$20 \pm 1^\circ\text{C}$	$51,3 \pm 4,8$	$72,6 \pm 6,3$
$25 \pm 1^\circ\text{C}$	$42,2 \pm 6,1$	$53,8 \pm 1,2$

Як видно з таблиці, найвищий відсоток схожості (72,6%) виявили за пророщування насіння *P. pratensis* при температурі  $20^\circ\text{C}$ .

Для вивчення початкових етапів онтогенезу в асептичних умовах насіння було висіяне у пробірку (рис 1а, 1б).



а



б

Рис. 1: а — початок проростання насіння; б — проростки *in vitro*

У ході проведених експериментів встановлено, що в умовах *in vitro* період проростання насіння збільшується удвічі і складає 65–70 діб (табл. 2), в умовах лабораторії насіння проростало в продовж 25–35 діб. При цьому схожість насіння *in vitro*

становить не більше  $23,6 \pm 1,3\%$ , тоді як лабораторна схожість насіння з тієї ж вибірки —  $53,8 \pm 1,2 - 72,6 \pm 6,3\%$ . На нашу думку, це пов'язано з дією на насіння стерилізуючих речовин та компонентів середовища.

## 2. Проходження початкових етапів онтогенезу рослин *P. pratensis* в умовах лабораторії та *in vitro*

Етапи розвитку	Тривалість діб	
	чашка Петрі	<i>in vitro</i>
Початок проростання	16	35
Утворення коріння	18	40
Поява сім'ядольних листків	24	46
Поява справжніх листків	30	52
Рослина з 1–2 коріннями і 3–4 листками	35	67

На початкових етапах віргінільного періоду (проростки і ювенільний стан) проростки в умовах лабораторії та *in vitro* розвиваються рівномірно, але в іматурному стані відмінності стають помітнішими. Це простежується не тільки у кількісних, але і у якісних параметрах, наприклад, форма листової

пластинки у іматурних особин *P. pratensis* в умовах *in vitro* зберігає ювенільні риси.

В ході експерименту досліджували залежність різних концентрацій 6-БАП і 1-НОК на кількість мікропагонів (рис. 2).

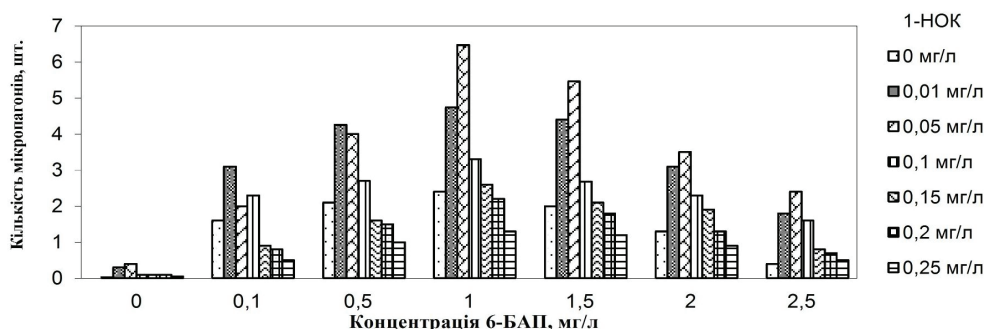


Рис 2. Кількість мікропагонів у залежності від концентрацій 6-БАП — 1-НОК

Встановлено, що мінімальний вміст у середовищах 1-НОК і 6-БАП (0–0,01 мг/л і 0–0,1 мг/л відповідно) — не викликав помітних морфогенних реакцій, спостерігали лише незначні потовщення біля основи пагонів. Підвищення концентрації 6-БАП до 1,5–2,5 мг/л в присутності 0,1–0,25 мг/л 1-НОК сприяло формуванню калусу на базальних кінцях пагонів. Активний розвиток пазушних меристем відбувався при додаванні 6-БАП 1,0 мг/л та 1-НОК 0,05 мг/л. На цьому середовищі через 4–6 тижнів кількість новоутворених пагонів становила п'ять-сім.

Кожен у середньому завдовжки 5–12 мм. Також формувалась велика кількість дрібних додаткових (адвентивних) бруньок біля основи первинних експлантів (рис. 3).

Сформовані пагони постійно відділялися та пересаджували на свіже живильне середовище, що сприяло збільшенню кількості клонів. Тривалість пасажу в середньому складала 3–6 тижнів і залежала від темпу росту та розвитку експлантів. В процесі культивування після двох-трьох пасажів спостерігали збільшення коефіцієнту розмноження до 6–8.



Рис. 3. Мікророзмноження *P. pratensis*

Дослідження початкових етапів культивування *P. pratensis* дає підставу сподіватися на розробку технології мікророзмноження для вирішення проблеми збереження виду в умовах *ex situ*.

#### Висновки

1. Встановлено, що кращою температурою для пророщування насіння *P. pratensis* в лабораторних умовах є 20°C.
2. Порівняльний аналіз онтогенетичного розвитку рослин показав, що ті які були отримані в умовах *in vitro*, характеризувались більш повільним проходженням початкових етапів онтогенезу порівняно з тими, які проростали в умовах лабораторії.
3. Для проходження морфогенезу експлантів виду *P. pratensis* на середовищі МС кращим варіантом фітогормональної модифікації було додавання 1,0 мг/л 6-БАП та 0,05 мг/л 1-НОК, в якому коефіцієнт розмноження досягав 6–8.

#### Перелік посилань

1. Бутило М. Д. Лікарські рослини Лісостепу

України, їх раціональне використання і збереження / М. Д. Бутило, С. І. Дениско, І. Л. Дениско. — Умань: Уманське ВПП, 2008. — 688 с.

2. *Глобальная стратегия сохранения растений.* — ВГСІ: Richmond, U.K., 2002. — 16 с.
3. Губергриц А. Я. Лекарственные растения Донбасса / А. Я. Губергриц, Н. И. Соломченко. — Донецк: Донбасс, 1990. — 280 с.
4. Калинин Ф. Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф. Л. Калинин, Г. П. Кушнир, В. В. Сарнацкая. — К.: Наук. думка, 1992. — 232 с.
5. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. А. Кунах. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
6. Кучеревський В. В. Атлас рідкісних та зникаючих рослин Дніпропетровщини / В. В. Кучеревський. — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — 360 с.
7. Новикова Т. И. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского ботанического сада / Т. И. Новикова, А. Ю. Набиева, Т. В. Полубоярова // Весник ВОГиС. — 2008. — Т. 12, № 4. — С. 564–572.
8. *Определитель высших растений Украины* / [Д. Н. Доброчаева, М. И. Когов, Ю. Н. Прокудин и др.]. — К.: Наук. думка, 1987. — 548 с.
9. *Методические указания по семеноведению интродуцентов.* — М.: Наука, 1980. — 63 с.
10. Фирсова М. К. Методы исследования и оценки качества семян / М. К. Фирсова. — М.: Сельхозгиз, 1955. — 376 с.
11. *Червона книга України. Рослинний світ* / Ред. Я. П. Дідух. — К.: Глобалконсалтинг, 2009. — 900с.
12. Murashige T. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. — 1962. — V. 15, № 13. — P. 473–497.

Рекомендує до друку  
А. А. Куземко

## СЕМЕННОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *PULSATILLA PRATENSIS* (L.) MILL. В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

М. В. Небыков, М. М. Чеканов  
Национальный дендрологический парк «Софиевка» НАН  
Украины

Описан способ семенного размножения растений *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill. в условиях *in vitro*. Исследованы всхожесть и прорастание семян в условиях лаборатории и *in vitro*, отработан режим стерилизации, подобран гормональный состав среды для активации морфогенных процессов.

## SEED REPRODUCTION *IN VITRO* *PULSATILLA PRATENSIS* (L.) MILL.

M. V. Nebykov, M. M. Chekanov  
National Dendrology Park of "Sofyivka" NAS of Ukraine

The method of seed propagation *in vitro* of plants *Pulsatilla pratensis* (L.) Mill. in culture conditions has been described. The early stages of ontogenesis *in vitro* have been researched. The regime of sterilization and hormonal structure of mediums for activation morphogenic processes have been carried out.

УДК 633.63: 631.52

М. М. Ненька, М. О. Корнеева  
Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

## СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНА ЦІННІСТЬ ЗАКРІПЛЮВАЧІВ СТЕРИЛЬНОСТІ І ЧС ЛІНІЙ БУРЯКА ЦУКРОВОГО ЗА ОЗНАКОЮ МАСА 1000 НАСІНИН

У статті наведено дані, що пояснюють генетичну детермінацію ознаки маса 1000 насінин у материнських компонентів — простих стерильних гібридів цукрових буряків. Виділено селекційно-цінні лінії з високими ефектами комбінаційної здатності для покращення господарчих якостей насіння.

### Вступ

Посівні якості насіння є важливим показником конкурентоспроможності гібридів буряку цукрового, які опосередковано впливають на їх продуктивність. Аналіз посівних якостей ускладнюється тим, що це кількісна ознака, яка залежить від багатьох складових, кожна з яких генетично зумовлена [1].

Генетична детермінація цієї ознаки у буряку цукрового вивчена недостатньо. Дослідженнями встановлено, що багатонасінних запилювачів лінії

різняються як за енергією проростання, схожістю насіння, так і за масою 1000 насінин [2]. Материнський компонент ЧС гібридів може бути представлений ЧС аналогами закріплювачів стерильності (О типи), або ж простими ЧС гібридами, одержаними від схрещування ЧС ліній з неспорідненими О типами. У даних материнських компонентах відмінності між селекційними зразками було виявлено на рівні фенотипу [3].