Науковий вісник Ужгородського університету
Серія Біологія, Випуск 32, 2012: 176-179
© Когут Е., Бенцур Ямборне Е., Ердег М., 2012



УДК 581.143.5:581.165.7:582.572.7(477.87)

# ВПЛИВ ОХОЛОДЖЕННЯ НА КУЛЬТИВУВАННЯ *LEUCOJUM AESTIVUM L.* (*AMARYLLIDACEAE*) В УМОВАХ *«IN VITRO»*

Когут Е., Бенцур Ямборне Е., Ердег М.

***Вплив охолодження на культивування Leucojum aestivum (Amaryllidaceae) в умовах «in vitro». – Е. Когут, Е Бенцур Ямборне, М. Ердег.*** *Leucojum aestivum декоративна лікарська рослина, що охороняється в Угорщині і на Україні. Метою нашої роботи було опрацювати методи культивування і розмноження цього виду в умовах «in vitro». До зовнішньої стерилізації цибулини очистили від відмерлих лусок і коренів, потім вони зберігались в холодильнику різні періоди при режимі (+2-3 $^0$ С): один тиждень для першого варіанту досліду, 5 тижнів для другого і 14 тижнів для третього варіанту. Після стерилізації сегменти цибулин, їх луски і проростілі зелені листки були розміщені на поживному середовищі Мурасіге Скуге з додаванням 1 мг/л бензиладеніну (БА) і 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК). Після першої ініціації 81,3%, після другої – 92,3%, і після третьої – 100% інокулюмів виявилися стерильними. На експлантатах диференціювалися цибулинки і корені. Найкращого результату було досягнуто після охолоджування впродовж 5 тижнів. Дрібні цибулинки вдалося отримати також із зелених листків цибулин.*

***Ключові слова****: Leucojum aestivum, культура «in vitro», стерилізація, охолодження, диференціація органів*

***Адреса:*** *Кафедра біології та хімії Закарпатського угорського інституту імені Ференца Ракоці II. Кафедра декоративного садівництва і дендрології Будапештського Університету ім. Корвіна, п/с 53, м. Будапешт, 1518 Угорщина; e-mail: kohute@kmf.uz.ua, erzsebet.benczur@uni-corvinus.hu, omate@tvnetwork.hu.*

***The effect of chilling on starting of in vitro cultures of Leucojum aestivum. – E. Kohut, E. Benczúr Jámborné, M. Ördögh.*** *Leucojum aestivum is a native, protected ornamental and medicinal plant in Hungary and in Ukraine too. The aim of our work was to establish in vitro cultures of this bulbous plant. Prior to surface sterilisation the old leaves and roots were dissected from the bulbs and they were stored in a refrigerator (2-3 oC) for different periods: one week for the first starting, 5 weeks for the second and 14 weeks for the third one. After sterilisation, bulbs, bulb scales and leaves of the bulbs were placed on Murashige and Skoog's [2] medium with 1 mgL-1 benzyl-adenine (BA) and 0,1 mgL-1 naphthalene acetic acid (NAA). At the first starting (experiment) 81,3 %, at the second one 92,3 %, and at the third experiment 100% of the explants turned to be sterile. Bulblets and roots were developed on the explants in the case of using bulb plates together with bulb scales and leaves as inoculum. The best result was achieved after 5 weeks chilling and it was possible to gain little bulbs from the green bulb-leaves too.*

***Key words****: Leucojum aestivum, in vitro culture, sterilisation, chilling, differentiation of organs*

***Address:*** *Ferenc Rákóczi II. Transcarpathian Hungarian Institute, Department of Biology and Chemistry, Corvinus University of Budapest, Faculty of Horticultural Science, Department of Floriculture and Dendrology, Hungary 1518 Budapest, Pf: 53; e-mail: kohute@kmf.uz.ua, erzsebet.benczur@uni-corvinus.hu, omate@tvnetwork.hu*

**Вступ**

Білоцвіт літній (*Leucojum aestivum* L.*)* декоративна і лікарська рослина, що охороняється. Завдяки високій привабливості цьому виду загрожує знищення внаслідок масового збору рослин як на території Закарпатської області України так і сусідньої Угорщини. Введення в культуру, шляхом розробки відносно швидкого способу розмноження в умовах «*in vitro*», дозволить забезпечити швидке та масове відтворення виду і таким чином зберегти його у природніх регіонах зростання.

Станілова М.І та ін. [1] повідомляють про регенерацію білоцвіту літнього в умовах «*in vitro*» з частин денця та верхівок цибулини, стебла і листка, відібраних у якості експлантатів. Для диференціації органів найкращим виявилося поживне середовище Мурасіге–Скуга [2] з додаванням 1,0 мг/л бензиладеніну (БА) і 1,0 мг/л кінетину. Також ними було отримано добрі результати на поживному середовищі Linsmaier, Skoog [3] з додаванням 1 мг/л кінетину і 0,5 мг/л НОК. Це середовище виявилося особливо сприятливим для органогенезу.

Савона та ін. [4] проводили дослідження на рідкісному *Leucojum nicaeense*. Метою їх дослідження було розробка технології мікроклонального розмноження з подальшим збереженням виду в умовах «ex situ» та повернення його у природні умови зростання. Вихідним матеріалом було стерилізоване насіння, яке витримували 20 хвилин у розчині гіпохлориту натрію, а потім двічі промивали стерильною дистильованою водою. Базове поживне середовище Мурасіге Скуга [2] доповнили 30 г/л цукру і 8 г/л агару. Для проростання насіння найбільш вдалим виявилось середовище, до якого додали як регулятор росту 0,5 мг/л БА і стільки ж індолілмасляної кислоти (ІМК). Для ініціювання росту коренів кращим за негормональне середовище виявилися середовища з вмістом ауксину (0,5-1,0 мг/л ІМК). Отримані регенеранти успішно акліматизували у вологих тепличних умовах.

У 2004 р. Караоглу [5] також повідомляє про вдале мікроклональне розмноження білоцвіту літнього. Вихідним матеріалом служили експлантати з 2-х і 4-х цибулинних лусок, а також нестиглі зародки. Найкращого результату (6,67 цибулинок) було отримано на базовому поживному середовищі МС, доповненому 1 мг/л БА і 1 мг/л НОК. З нестиглого зародка ним отримано лише 2,27 цибулинок на поживному середовищі доповненому 0,5 мг/л БА і 4 мг/л НОК. Ініціацію корінців ним успішно було досягнуто з використанням 1 мг/л НОК на базовому середовищі МС. Регенеранти з корінцями були акліматизовані на компості.

Успішного мікроклонального розмноження було досягнуто і у нарцису (*Narcissus)* [6]. Види цього роду мають схожий з представниками роду *Leucojum* габітус і будову цибулини. Кращий результат було отримано з експлантатів часток цибулин на середовищі МС з половинною концентрацією макроелементів з застосуванням 1 мг/л БА і 0,1 мг/л НОК.

Мікроклональним розмноженням роду підсніжник (*Galanthus*), який є близьким родичем роду білоцвіт займалися Тілі-Манді та ін. [7]. Мікроклональне розмноження *Galanthus elwesii* Hook. f. ініціювали з цибулинних лусок з наступним вивченням впливу різних цитокінінів, ауксинів і цукрів. Найкращий результат і найбільші цибулинки були отримані на поживному середовищі з вмістом 2,0 мг/л БА + 2,0 мг/л ІМК з додаванням 20 г/л сахарози. 25% цибулинок мали більш ніж 5 мм в діаметрі і були успішно акліматизовані.

Метою нашої роботи було отримання стерильного матеріалу і вивчення впливу охолодження різної тривалості на диференціацію зачатків з різних частин цибулини *L. aestivum*.

**Матеріали і методи**

Цибулини *L. aestivum* були зібрані нами 18 липня 2006 р на території Великодобронського зоологічного заказника (Закарпаття). Досліди виконувалися у лабораторії мікроклонального розмноження кафедри декоративного садівництва і дендрології Будапештського Університету ім. Корвіна (Угорщина).

Перед початком поверхневої стерилізації з цибулин видалили всі листки і корені і поклали їх в холодильник з температурою 2-3 $^0$C. Тривалість охолодження була наступна: 1) один тиждень нестерильні (перша ініціація, перший дослід); 2) 5 тижнів (ініціація другого досліду) і 3) 14 тижнів (ініціація третього досліду). Цибулини другого і третього варіантів досліду попередньо стерилізували і цілими помістили на негормональне поживне середовище. Стерилізацію розпочали з очищення поверхні цибулин, потім дві години промивали проточною водопровідною водою. Після цього цибулини занурили на 10 хвилин в 70% етанол і 15 хвилин стерилізували в 0,1% розчині $HgCl_2$ і накінець тричі промили стерильною дистильованою водою.

У першому варіанті досліду стерильні цибулини розрізали на частки таким чином, щоб кожна частка була з шматочком денця. Облікова кількість інокулюмів становила 16 шт. У другому і третьому варіантах досліду експлантатами служили верхівки охолоджених цибулин (верхня частина цибулинних лусок) і відрослі за цей час зелені листки. Облікова кількість інокулюмів становила 13-17 шт. За базове поживне середовище було використано половинну концентрацію середовища Мурасіге-Скуге [2], доповнене 1 мг/л бензиладеніну (БА), 0,1 мг/л НОК і 30 г/л сахарози (Е1). Готове поживне середовище перед автоклавуванням було доведене до pH 6,5 1 N KOH. Експлантати помістили у 100 мл колби Ерленмейера і вирощували впродовж 12 тижнів при температурі 20-24 $^0$C при фотоперіоді 8/16 годин (темрява/світло).

Під час досліду підраховували кількість та розміри цибулинок і коренів. Диференціація цибулинок була зафіксована на знімках з допомогою скануючого електронного і світлового мікроскопів.

**Результати та їх обговорення**

Під час першого досліду 81,3% експлантатів виявилися стерильними, з них на 69,2% диференціювалися цибулинки. На 38,5% експлантатів розвинулися корінці. Кількість цибулинок на інокулюм складала 1,8, а їх довжина в середньому сягала 2,8 мм. Середня кількість коренів – 1,8, довжина – 27,5 мм.

У другому варіанті досліду на кожному стерильному експлантаті (92,3%) диференціювались проростки, в середньому 11,77

шт., завдовжки близько 3,7 мм. Корінці утворилися на 38,5% інокулюмів, а середня кількість коренів становила 1,2 шт., середня довжина – 53,4 мм. На верхівках цибулин відросли листки і використавши їх у якості інокулюмів отримали значну кількість цибулинок (рис. 1). Слід відзначити, що експлантати з цибулинних лусок трохи позеленіли, а на цибулинках диференціювались і корінці (рис. 2).

У третьому варіанті досліду було одержано 100% стерильних експлантатів. Найкраща диференціація була відмічена на зелених листках, на 85% з яких утворились проростки, середня кількість яких становила 7,41 шт. На рис. 3 (фото зроблено з допомогою скануючого електронного мікроскопу) показано диференціацію проростків на листках. Ці матеріали більш детально і наглядно представлені на графіках рис. 4, 5, 6.

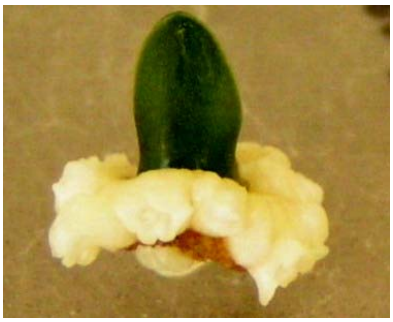


Рис. 1. Диференціація проростків на експлантатах з зелених листків після 12 тижнів культивування (поживне середовище E1).
Fig. 2. Shoot and root differentiation on a leaf explant after 12 weeks in culture (medium E1)

Рис. 2. Диференціація цибулинок і коренів на експлантатах з лусок після культивування впродовж 12 тижнів (поживне середовище E1).
Fig. 2. Shoot and root differentiation on a leaf explant after 12 weeks in culture (medium E1)

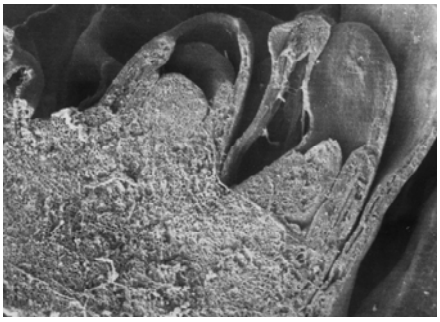
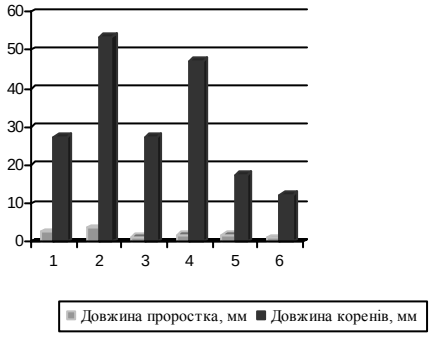


Рис. 3. Поздовжній зріз проростка з диференційованими апікальними меристемами і трьома листковими примордіями, утворених на базальній частині цибулинної луски *L. aestivum* (x41)-скануючий мікроскоп.
Fig. 3. Longitudinal section of shoots with apical meristem and three leaf primordium on the basal part of bulb-leaf of *L. aestivum* (x 41, SEM photo)



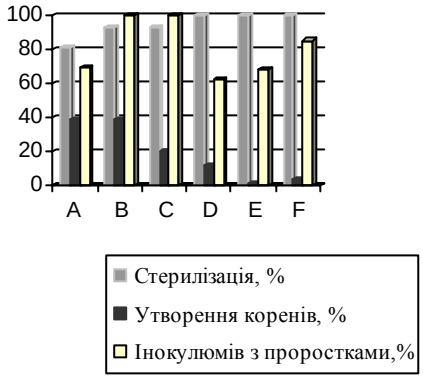




Рис. 4. Результати мікроклонального розмноження цибулин *L. aestivum* –співвідношення довжини проростка і довжини кореня у різних варіантах досліду: 1 – I варіант (в.) з цибулинних лусок; 2 – II в. з цибулинних лусок; 3 – II в. з відрослих листків; 4 – III в. з цибулинних часток; 5 – III в. з цибулинної луски; 6 – III в. з відрослих листків

Рис. 5. Співвідношення відсотка стерилізації, утворення коренів і частки інокулюмів з проростками у різних варіантах досліду: 1 – I варіант (в.) з цибулинних лусок; 2 – II в. з цибулинних лусок; 3 – II в. з відрослих листків; 4 – III в. з цибулинних часток; 5 – III в. з цибулинної луски; 6 – III в. з відрослих листків.

Рис. 6. Співвідношення кількості проростків та кількості коренів у різних варіантах досліду: 1 – I варіант (в.) з цибулинних лусок; 2 – II в. з цибулинних лусок; 3 – II в. з відрослих листків; 4 – III в. з цибулинних часток; 5 – III в. з цибулинної луски; 6 – III в. з відрослих листків.

З трьох варіантів дослідів найкращий результат одержано внаслідок 5-тижневого охолодження часток цибулин. Новим методом можна вважати збереження стерильних цибулин в умовах охолодження до початку препарування інокулюмів, тобто до розміщення їх на стартове поживне середовище. Тривалість оптимального періоду охолодження подібна як у випадку з нарцисом, з тою відмінністю, що цибулини нарцису не були стерилізованими до охолодження. Поживне середовище за складом було подібне до описаних Станіловою та ін. [1], але без використання кінетину.

Караоглу [5] індукував експлантати з частинок цибулин, що містили по дві і чотири луски з найкращим результатом 6,67 шт. цибулинок на базовому поживному середовищі МС з додаванням 1 мг/л БА і 1 мг/л НОК. Ми використовували нижчу концентрацію НОК (0,1 мг/л), отримавши таким чином кращих результатів навіть після 5 тижневого охолодження. Таке ж поживне середовище забезпечило найкращі результати при мікроклональному розмноженні нарцису [6].

**Висновки**

Вперше апробовано метод збереження стерильних цибулин в умовах охолодження до початку препарування інокулюмів і описано диференціацію проростків з листків. На експлантатах листового походження відмічено появу корінців.

Стерильними виявилися після першої ініціації 81,3%, після другої – 92,3%, і після третьої – 100% інокулюмів. На експлантатах диференціювалися цибулинки і корені.

Найкращого результату було досягнуто після охолоджування впродовж 5 тижнів і вирощуванні на базовому поживному середовищі МС з додаванням 1 мг/л бензиладеніну (БА) і 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК).

Автори висловлюють щиру подяку за підтримку «Угорську Закордонну Наукову Програму Грантів» Угорської Академії Наук – OTKA: T-049642.

1. Stanilova M.I., Ilcheva V.P., Zagorska N.A. Morphogenetic potential and *in vitro* micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* // Delip. Plant Cell Reports. – 1994. - 13 (8). – P. 451-453.
2. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – 155. – P. 473-497.
3. Linsmaier E.M., Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1965. – 18. – P. 100-127.
4. Savona M., Ruffoni B., Minuto L., Carli S., Profumo P. *Leucojum nicaense* Ard.: application of the in vitro culture to preserve the biodiversity // Italus Hortus. – 2004. - 11 (4). – P. 138-140.
5. Karaoğlu C. *In vitro* propagation of summer snowflake // Master Thesis. – 2004. - 38 p. (http://72.14.221.104/search?q=cache:X_xsbdsosl4J:papirus.ankara.edu.tr/tez/FenBilimleri/Yuksek_Lisans_Tezleri/2004/FY2004_184/Ozet.pdf+Leucojum+in+vitro&hl=hu&gl=hu&ct=clnk&cd=5)
6. Jámborné Benczúr E., Márta K.-né, Peredi A. Micropropagation of daffodils // Publicationes Universitatis Horticulturae Industriaeque Alimentariae ( Budapest). - 1989. – LII. – P. 101-107.
7. Tilly-Mándy A., Jámbor-Benczúr E. , Szabó J. Results with the Micropropagation of *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis* // „Flore Pleno" Acta Hort. – 2006. – 725, Vol. 1. - P. 439-443.

Отримано: 11 верезня 2012 р.
Прийнято до друку: 12 листопада 2012 р.