

УДК 581.143.5:581.165.7:582.572.7(477.87)

ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ ТА РЕГЕНЕРАЦІЇ РІДКІСНИХ ВИДІВ ШАФРАНІВ В УМОВАХ „IN VITRO”

В.О. Романко¹, В.І. Ніколайчук²

Особливості морфогенезу та регенерації рідкісних видів шафранів в умовах „in vitro”. – В.О. Романко¹, В.І. Ніколайчук². – Виявлено морфогенні реакції у експлантів бульбоцибулин та їх частин, апексів шафранів банатського та Гейфеля в умовах „in vitro” на модифікованому середовищі Мурасіге і Скуга фітогормонального складу 3 мг/л БАП та 1 мг/л НОК. Встановлено залежність при культивуванні між різними типами експланту та інтенсивністю морфогенних проявів. Досліджено особливості регенерації пагонів та формування бульбоцибулин.

Ключові слова: шафран банатський та Гейфеля, морфогенні реакції, умови „in vitro”, калюс, адвентивні пагони, латеральні точки росту.

Адреса: ¹Закарпатський територіальний відділ карантину рослин ІЗР УААН, вул. Університетська, 21, 88000, Україна; ²Ужгородський національний університет, вул. Волошина, 32, Ужгород, 88000, Україна.

Features of morphogenesis and regeneration rare species of crocus in vitro condition. – V. Romanko, V. Nikolaichyk. – Morphogenic reactions at explants of bulbotubers and their parts, shoot apices of *Crocus banaticus* J. Gay, and *Crocus heuffelianus* Herb. in conditions „in vitro” and on the modified Murashige and Skoog medium phytohormonal structure of 3 mg/l BAP and 1 mg/l NAA are revealed. Dependence fixed at cultivation between different types of explant and intensity of morphogenic displays. Features of propagules regeneration and bulbotubers formations are investigated.

Key words: *Crocus banaticus* J. Gay, *Crocus heuffelianus* Herb., morphogenesis reaction, condition "in vitro", callus, adventives propagules, lateral points of growth

Address: ¹Transcarpathian territorial department of the plant quarantine IPP UAAS Universytetska, 21, Uzhgorod, 88017; ²Uzhhorod National University; 32, Voloshyna St., Uzhhorod, 88000, Ukraine.

Серед рослин природної флори Карпат, що потребують охорону та одні з найбільш вразливих до антропогенного пресу є ефемероїди. Вони відносяться до однієї найбільш цікавих та слабо вивчених груп рослин [1].

Особливе місце серед ефемероїдів займають представники роду *Crocus* L. такі як шафран банатський та (*Crocus banaticus* J. Gay) – гістерантний геофіт та шафран Гейфеля (*Crocus heuffelianus* Herb.) – ранньовесняний ефемероїд. Місцезростання шафрана Гейфеля на території України здебільшого локалізовано в Карпатах, а шафрана банатського виключно лише на Закарпатті [2, 3, 4, 5]. Це червонокнижні види [6, 7, 8, 9, 10] з високодикоративними [11] та медоносними властивостями [12, 13, 14, 15], що відзначаються особливими строками цвітіння і цим самим робить їх популярними в квітникуарстві та бджільництві. Крім того деяких представників роду шафранів широко використовуюється в харчовій промисловості та медицині [3, 16]. Проте популяції шафрана в Закарпатті поступово скорочуються внаслідок дії антропогенного фактору [11]. Особливо нега-

тивне значення має масове зривання квітів, що суттєво знижує ефективність насіннєвого розмноження [11, 17], і може призвести до повного зникнення популяцій. А враховуючи і те, що в шафранів квітка утворюється лише на 4 - 5 році життя [11], то стає зрозумілим не лише масштабність загрози зникнення популяцій, однак і неможливість швидкого їх відтворення за традиційними методиками охорони рослин.

В цьому аспекті важлива розробка біотехнологічних методів розмноження. Мова йде про швидкий і високоефективний метод розмноження видів, різновидностей і клонів з різних ізольованих органів, тканин та клітин, ефективність якого в декілька сот та тисяч разів вища за традиційні [18]. Крім того, метод культури відіграє важливу роль і в оздоровленні рослин та уникненні дефектних ознак, які нагромадились під впливом різних негативних факторів [19, 20].

Дослідження в галузі морфогенезу рослин набули особливої популярності. Принципово важлива властивість морфогенезу – універсальність його шляхів в умовах in vivo та in vitro. Така уні-

версальність дозволяє вибрати простішу, ніж цілісний організм, модель для вивчення особливостей морфогенетичних процесів. Вдалими моделями слугують ізольовані культури органів і тканин, які вирощують в контрольованих умовах, на основі екзогенних гормональних добавках, що здатні повною мірою проявити свій морфогенетичний потенціал, при чому контролюючі умови дозволяють керувати цими процесами у визначеному напрямку [21, 22, 23, 24, 25].

Однак, слід відзначити, що не існує універсальної технології культивування в умовах *in vitro*, щоб слугувала для всіх видів рослин, і цим самим забезпечувала формування цілих рослин-регенерантів. Для кожного виду виникає необхідність в розробці спеціальних методичних заходів. Крім того не кожен вид або навіть сорт здатний проявляти морфогенез в штучному середовищі.

Результати досліджень в напрямку масового культивування дикорослих видів шафрану банатського та шафрану Гейфеля в умовах „*in vitro*” в літературі – відсутні.

Тому метою нашої роботи було встановити морфогенетичний потенціал шафранів банатського та Гейфеля в умовах „*in vitro*” та дослідити можливість регенерації пагонів і бульбоцибулин.

Методика дослідження

Матеріалом досліджень слугували бульбоцибулини шафрана банатського та Гейфеля. Технологію мікророзмноження виконували за методами Ф. Л. Калініна та ін. (1992) [26] з доповненням Є. Л. Міляєвої та ін. (1995) [16]. Застосовували модифікаційне середовище Мурасіге і Скуга з БАП (3мг/л) та НОК (1мг/л).

Стерилізацію вихідного матеріалу проводили за схемою етиловий спирт (70%, 1 хв.) → ополіскування (стерильна дистильована H₂O, 5 хв., 1 раз) → білизна (комерційний препарат, 15 %, 30 хв.) → ополіскування (стерильна дистильована H₂O, по 5 хв., 3 рази).

Пересадку досліджуваного матеріалу проводили в ламінарних боксах при стерильних умовах. Вичленювання бульбоцибулин на частини здійснювали на стерильній чашці Петрі за допомогою скальпелю. Інший вихідний матеріал ставили безпосередньо в пробірку. При необхідності використовували препарувальну голку. Наразі наявності крапельок води на стінках пробірки, уникали за допомогою стерильного тампону. Пробірки закривали кришечками з фольги. Для надійності обмотували кришечки резиновими кільцями. Після завершення пересадки вихідного матеріалу, пробірки ставили на спеціальні стелажі з під світлою. Вирощування проводили при температурі 10 – 26 ° С, 16-ти годинного штучного освітлення. Фіксували кількість живих, некротичних та заражених експлантів. Дані фіксували на 15, 30 добу, при необхідності на 45, 60 і

так далі. Крім того визначали морфогенетичну здатність різних типів експлантів – наявність калюсу, кількість активованих бічних бульбобруньок та бруньок *de novo*. Спостерігали за динамікою росту.

Нами були обрані наступні типи експланту: 1). Апекси. На чашці Петрі проводили виділення апексу від бульбоцибулини. 2). Частини бульбоцибулин. Розрізали скальпелем бульбоцибулину на три частини (вертикальний розріз). 3). Частини асимілюючих листків. Розрізали листок на декілька частин розміром 1,5 – 2 см. 4). Цілі бульбоцибулини.

Кількість експлантів у вибірці становила – 30.

Роботу по мікророзмноженню проводили в біотехнологічній лабораторії кафедри генетики і фізіології рослин.

Результати та обговорення

При культивуванні в штучних стерильних умовах уже через 5 – 15 діб після посадки первинного експланту з апексів спостерігали їх ріст. По мірі збільшення часу культивування водночас з ростом апексів на нижній частині виявляли наявність на ріст сплячих бічних бульбобруньок. Подібну активацію спостерігали і в експлантів бульбоцибулин та їх частин. Як правило, сплячі бічні бульбобруньки представляли собою темні вирости, що розміщені на поверхні бульбоцибулин. Внаслідок активації відбувалося видовження та потовщення бруньок, що через 30 діб призвело до утворення пагонів. В процесі культивування основа пагонів помітно починала потовщуватися, при цьому приймаючи форму бульбоцибулини. Водночас з потовщенням дна пагонів виявляли наявність напівпрозорих поверхневих тканин, які з часом змінювали забарвлення до бруднувато-жовтуватого. Через 2, 3 місяці після посадки початкового експланту, утворені бульбоцибулини із пагонів візуально не відрізнялися від бульбоцибулин-діток в природних умовах. При пересадці бульбоцибулин-регенерантів на свіже поживне середовище, фіксували знову активацію сплячих бічних точок росту. Не дивлячись на наявність контрольованих умов культивування, сезонний цикл бульбоцибулин-регенерантів повністю співпадав з природними умовами. Так, в літні місяці, коли бульбоцибулини в природних умовах знаходяться в стані фізіологічного спокою, на бульбоцибулинах-регенерантів теж відмічали подібну тенденцію: зміна забарвлення покривної тканини, підсихання пагонів та коренів. При цьому в кінці осені спостерігали знову фізіологічну активність. Крім того, незалежно в який період здійснювали пересадку експланту, чи в літній чи в зимній період, в умовах *in vitro* найвищу фізіологічну активність спостерігали на протязі грудня – квітня. При цьому, для отримання адвентивних пагонів була

обов'язкова наявність низької за кімнатну температуру від 10 до 14 ° С, що є характерним для даної групи рослин.

Слід відзначити, що поряд з процесом активації вже існуючих меристем (бічних бульбобруньок) нами зафіксовано і інший тип мікророзмноження. Мова йде про утворення бруньок *de novo* із калюсної тканини. Так, при культивуванні апексів через 30 діб фіксували наявність та наростання калюсної тканини. Через 60 діб відмічали процеси пагоноутворення. Проте остаточне формування бульбоцибулин-регенерантів по даному методу не відмічали.

Інший шлях – індукція адвентивних пагонів, що виникли безпосередньо із спеціалізованих тканин експланту (в нашому випадку із епідермісу бульбоцибулин). Цей тип мікророзмноження існує завдяки виникненню із спеціалізованих диференційованих клітин експланту так званих меристемальних скупчень, з яких і формуються па-

гони. Початок індукції адвентивних пагонів бульбоцибулинних експлантів та їх частин фіксували в зимній період. По мірі культивування кількість пагонів збільшувалась до декілька десятків на одному експланті без пасинкування. Крім того, відмічали їх ріст та зміну забарвлення на зелений колір. На відміну від методу ізольованих апексів при калюсоутворенні, тут фіксували потовщення пагонів в їх нижній частині, що в кінцевому випадку призводило до формування бульбоцибулин-регенерантів. Проте, при індукції адвентивних пагонів проходило глибоке омолодження бульбоцибулин-регенерантів. Тобто знаходились в ювенільній або імагурній вікових фазах. При активації латеральних бульбобруньок (активація вже існуючих меристем) знаходилися в дорослому стані.

Проте, наявність соматичного ембріогенезу, тобто утворення біполярних структур, нами не було зафіксовано.

Таблиця 1. Морфогенетичні реакції експлантів *Crocus banaticus* та *Crocus heuffelianus* в культурі тканин та органів.

Експлант	Морфогенетичні реакції		
	Активація латеральних точок росту	Індукція адвентивних пагонів	Калюсоутворення
Апекс	+	-	+
Бульбоцибулини	+	+	+
Частини бульбоцибулин	+	+	+
Частини асимілюючого листка	-	-	-

Таким чином, виявлено певні морфогенні реакції експлантів, що були взяті з різних органів шафранів. А саме: 1) процес активації латеральних точок росту (вже існуючих меристем) в експлантів з бульбоцибулин та їх частин, апексів; 2) індукція адвентивних (додаткових) пагонів в експлантів з бульбоцибулин та їх частин; 3) індукція калюса експлантів з бульбоцибулин та їх частин, апексів (табл. 1).

Особливе значення в проходженні тієї чи іншої морфогенної реакції слід надати вибору первинного експланту. Так в таблиці 1 видно, що найбільшою морфогенною здатністю володіли експланти бульбоцибулин та їх частин, де було зафіксовано всі вищезазначені морфогенні реакції. Найнижчою (нульовою) – сегменти асимілюючого листка, де нами не виявлено жодних проявів морфогенезу.

Здатність до морфогенезу та регенерації проявляється не в однаковій мірі у різних органах однієї й тієї ж самої рослини – є загальноприйнятим явищем [18, 27]. Так у літературі наводяться приклади залежності від типу експланту, в деяких бульбоцибулинних рослин та їх морфогенної та регенераційної можливості. В фрезії найвищу регенераційну здатність було виявлено з експлантів генеративної бруньки та з тканин бульбоцибулин [27]. У гладіолусів максимальну здатність до ре-

генерації відмічали у сегментів квітконоса [26]. В шафрана Королькова та алавського найвищу морфогенну здатність виявлено у сегментах бульбоцибулин та ізольованих бруньок, де крім індукції пагонів встановлено і соматичний ембріогенез [28].

Рослинні клітини, тканини та органи *in vitro* здатні повною мірою проявляти свій морфогенетичний потенціал. Проте, в однакових умовах клітини однотипних експлантів можуть проходити різні морфогенні реакції або їх сумісна наявність [27]. Подібні явища було зафіксовано і в наших дослідженнях. А саме, при однакових контрольованих штучних умовах в однотипних експлантах встановлено різні морфогенетичні реакції з певним співвідношенням. Проте, майже в кожному запропонованому варіанті по типу експланту визначали й домінуючий морфогенетичний прояв (табл. 2). Так згідно попередніх результатів у експлантів з апексів у шафрана банатського наявність активації вже існуючих меристем становило 60, 06 %; наявність калюсу з подальшим розвитком пагонів – 25,79 %; сумісна наявність калюсу та активації латеральних бульбобруньок – 5,27 %; не виявлено жодної морфогенної реакції – 7,9 % експлантів. Наявність адвентивних пагонів – відсутня.

Таблиця 2. Співвідношення наявності морфогенетичних реакцій у різних типів експлантів.

Тип експланту	Морфогенетичні реакції					
	Калюс	Активация л. т. р.	Індукція адв. паг.	Л. т. р. + адв. паг.	Л. т. р. + калюс	Не має
<i>Crocus banaticus</i>						
Апекс	25,79± 5,84	60,06± 19,13	0	0	5,27± 4,73	7,90± 5,60
Сегменти бульбоцибулин	0	65,50± 1,24	6,68± 3,42	21,12± 6,22	0	6,68± 3,41
Бульбоцибулини	0	27,86± 6,92	41,07± 9,96	16,02± 2,98	0	15,85± 3,94
<i>Crocus heuffelianus</i>						
Апекс	19,94± 2,30	57,19±1,65	0	0	17,32± 6,27	5,56± 4,70
Сегменти бульбоцибулин	5,88± 4,00	57,82± 4,51	5,66± 3,27	17,99± 7,41	0	14,61± 1,49
Бульбоцибулини	2,94± 2,79	36,47± 13,00	26,74± 9,90	18,9± 3,95	0	14,9± 1,07

Примітка: л. т. р. - латеральні точки росту; адв. паг. – адвентивні пагони.

Подібне співвідношення спостерігали і в шафрана Гейфеля, де слід відзначити високий показник сумісної наявності калюсу та активованих бічних меристем – 17,32 %. Адвентивні пагони не виявлено.

При культивуванні частин бульбоцибулин у шафрана банатського найвищий показник зафіксовано у експлантів з активацією вже існуючих меристем – 65,5 %; адвентивних пагонів – 6,68 %; бічних бульбобруньок та адвентивних пагонів – 21,12 %; не має жодного морфогенетичного прояву в 6,68 %. Наявність калюсу – відсутня. У шафрана Гейфеля показники наявності вищезгаданих морфогенетичних проявів – нижчі, в порівнянні з показниками у шафрана банатського. Крім того, у шафрана Гейфеля виявлено 5,88 % експлантів з калюсною тканиною та в 14,66 % - не встановлено жодних марфогенних реакцій.

По мірі культивування цілих бульбоцибулин у шафрана банатського зафіксовано наступне співвідношення регенераційних проявів. Найвищий показник – індукція адвентивних пагонів (41,07 %); активація бічних бульбобруньок – 27,86 %; адвентивні пагони та бічні бульбобруньки – 16,02 %; не виявлено жодних проявів у 15,85 % експлантів. У шафрана Гейфеля найвищий показник наявності встановлено у експлантів з активацією вже існуючих меристем – 36,47 %; адвентивних пагонів – 26,74 %; адвентивних пагонів та бічних меристем – 18,9 %; наявність калюсу – 2,94 %; не має жодних реакцій в 14,9 % експлантів (табл. 2).

Аналізуючи співвідношення наявності морфогенетичних реакцій між видами шафранів встановлено незначні відміни. Так, в шафрана банатського вищі показники виявлено у експлантах з ак-

тивацією вже існуючих меристем – 52,2 %; індукції адвентивних пагонів – 14,00 %. У шафрана Гейфеля вищі показники встановлено у експлантів з калюсом 8,82 %, бульбобруньки та адвентивні пагони 11,18 %, бульбобруньки та калюс – 3,52 %, не виявлено жодних проявів у 14,11 % експлантів.

Таким чином, вищенаведені результати вказують на можливість вирощування та розмноження шафранів банатського та Гейфеля в культурі тканин та органів. Проте, слід відзначити, що на модифікованому середовищі Мурасіге і Скуга з БАП (3мг/л) та НОК (1мг/л) остаточне формування бульбоцибулин-регенерантів проходило лише за рахунок активації вже існуючих меристем (латеральних точок росту) або з утворених адвентивних пагонів в меристемальних зонах. При індукції калюса спостерігали початковий ріст пагонів, однак подальшу регенерацію не виявляли. Наявність соматичного ембріогенезу, тобто утворення біполярних структур, нами не було зафіксовано.

Висновки

Виявлено морфогенні реакції експлантів шафранів в умовах „in vitro”. Встановлено залежність при культивуванні між різними типами експлантів та інтенсивності морфогенезу. На модифікованому середовищі Мурасіге і Скуга фітогормонального складу 3 мг/л БАП та 1 мг/л НОК для культивування оптимальним було введення первинного експланту з бульбоцибулин та їх частин, де інтенсивно проходили різні морфогенні реакції з подальшим ростом пагонів та утворенням бульбоцибулин-регенерантів. Встановлено залежність фізіологічної активності експлантів від річного

циклу, що обумовлено ендегенним сезонним ритмом і не суттєво залежало від зовнішніх факторів.

1. Кричвалуший В. В., Комендар В. И. Биозология редких видов растений (на примере эфемероидов Карпат). – Львов: Світ, 1990. – 160 с.
2. Чопик В. І. Рідкісні рослини України. – К: Наук. думка, 1970. – 188 с.
3. Чопик В. И. Редкие и исчезающие растения Украины. – К.: Наукова думка, 1978. – 216 с.
4. Фодор С.С. Флора Закарпаття. – Львів, 1974. – 207 с.
5. Мигаль А. В. Поширення *C. banaticus* J. Gay на Заході України // Науковий вісник УжНУ. – Серія: Біологія. – 1998. – № 5. – С. 44-46.
6. Красная книга СССР: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений. – М.: Лесная промышленность, 1984. – Т.2. – 480 с.
7. Червона книга України. Рослинний світ: / Редкол.: Щеляг-Сосонко Ю.Р. (відп. ред.) та ін. – К.: “Українська енциклопедія” ім. М.П. Бажана, 1996. – 608 с.
8. Комендар В.І., Фодор С.С., Вайнагій І.В. Список ендемічних, рідкісних і зникаючих видів рослин і тварин. Рослини, що охороняються // Природні багатства Закарпаття. – Ужгород: Карпати, 1987. – С. 279-283.
9. Андрієнко Т.Л., Якушина Л.А. Види, занесені до “Червоної книги Української РСР”, у флорі заповідників республіки // Укр. ботан. журн. – 1989. – Т. 46, № 2. – С. 77-80.
10. Андрієнко Т.Л., Ткаченко В.С., Онищенко В.А. Судинні рослини Червоної книги України та Європейського Червоного списку в заповідниках України // Укр. ботан. журн. – 1998. – Т. 55, № 3. – С. 311-315.
11. Мигаль А. В. Біолого-екологічна характеристика видів роду *Crocus* L. в Українських Карпатах та заходи по їх охороні: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2002. – 22 с.
12. Глухов М.М. Медоносні растения. – М.: Сельхозгиз, 1955. – 512 с.
13. Глухов М.М. Медоносные растения. – М.: Колос, 1974. – 304 с.
14. Комендар В. І., Маківчук Ю. В. Медоноси Карпат. – Ужгород: Карпати, 1975. – 176 с.
15. Комендар В. І. Зелені перлини Карпат. – Ужгород: Карпати, 1985. – 85 с.
16. Миляева Э. Л., Азизбекова Н. Ш., Комарова Э. Н., Ахундова Д. Д. Формирование клубнелуковиц – регенерантов шафрана посевного (*Crocus sativus* L.) в культуре in vitro // Физиология растений. – 1995. – 42, № 1. – С. 127-134.
17. Комендар В. І. Проблеми охорони фітогенетичного фонду Карпат // Укр. ботан. журн., 1988. – 45, №1. – С. 1-6.
18. Рудишин С. Д. Основи біотехнології рослин: Навч. пос. – Вінниця: МП „Запал”, 1998. – 224 с.
19. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
20. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
21. Бутенко Р. Г. Дифференциация и морфогенез в культуре тканей, клеток и протопластов // Биология развития растений – М.: Наука, 1984. – С. 42-54.
22. Бутенко Р. Г. Состояние и перспективы изучения морфогенеза растений // Всесоюз. об-во физиологов растений – 1990. – Вып. 8. – С. 5-8.
23. Бутенко Р. Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений in vitro // I Чайлахян. Чтение. – Пушино: Пушинский Н. Ц. – 1994. – С. 7-26.
24. Марченко А. О. Реализация морфогенетического потенциала растительных организмов // Успехи совр. биол. – 1996. – 116, №3. – С. 306-319.
25. Батыгина Т. Б., Васильева В. Е., Маматьева Т. Б. Проблемы морфогенеза in vivo и in vitro (Эмбриогенез у покрытосеменных) // Ботан. журн. – 1978. – 63, №1. – С. 87-111.
26. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микрклонального размножения растений. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.
27. Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
28. Нурмуханбетова Г. А. Действие цитокининов и ауксинов на регенерационные процессы при микроразмножении редких видов шафрана: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ташкент: ТГУ, 1984. – 21 с.

Отримано: 10. листопада 2006 р.

Прийнято до друку: 17 січня 2007 р.