

ТВАРДОВСЬКА М.О.[✉], КУНАХ В.А.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, ORCID: 0000-0002-9132-1330, 0000-0002-9418-3172

[✉] maryana.tvardovska@gmail.com**КУЛЬТУРА *IN VITRO* ZINGERIA BIEBERSTEINIANA (CLAUS) P. SMIRN.
ЯК МЕТОД ЗБЕРЕЖЕННЯ ТА ВІДНОВЛЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ**

Мета. Підбір умов для введення рослин у культуру *in vitro*, індукції калусоутворення та тривалого вирощування культури тканин *Zingera biebersteiniana* (Claus) P. Smirn. **Метод.** Клональне розмноження *in vitro*, метод культури тканин. **Результати.** Виявлено значне підвищення ефективності проростання насіння після тривалої холодової стратифікації. Підібрано схему стерилізації насіння з виходом асептичних проростків 57,3%. Отримано колекції рослин *in vitro* та закритого ґрунту. Проведені експерименти з адаптації розмножених *in vitro* рослин до умов закритого ґрунту виявили високий рівень їх приживання. Для клонування рослин *in vitro* оптимальним було середовище МС, доповнене 0,1 мг/л НОК, а для індукції калусоутворення та тривалого культивування калусних тканин – В₅, доповнене 2 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л БАП. **Висновки.** Розроблено умови проростання насіння, клонального розмноження *in vitro*, індукції калусоутворення, а також тривалого вирощування культури тканин *Z. biebersteiniana*. Запропоновані способи культивування *in vitro* можуть бути використані для збереження та відновлення генетичного різноманіття виду, а також для отримання достатньої кількості рослинного матеріалу для подальших досліджень.

Ключові слова: *Zingera biebersteiniana* (Claus) P. Smirn., проростання насіння, рослини *in vitro*, індукція калусоутворення, культура тканин.

Цингерія Біберштейна (*Zingera biebersteiniana* (Claus) P. Smirn.) – ефемер, однорічний вид родини Злакові (*Poaceae*), ендемік Східної Європи з диз'юнктивним ареалом, релікт флори Давнього Середземномор'я [1; 2]. Цей вид не формує стабільні популяції, а зростає невеликими локальними групами і відновлюється лише в роки зі сприятливими умовами. На території України відомий лише один зразок

Z. biebersteiniana з гербарію Траутфеттера, зібраний у Криму в першій половині XIX століття. Майже двісті років по тому жодного екземпляра виду знайдено не було. Це один із 12 видів, які входять до списку рослин Червоної книги України зі статусом «зниклий у природі» [2]. Деякі дослідники вважають його «пульсуючим» видом Кримської флори [3; 4]. Окрім того, це один із 5 видів покритонасінних рослин із двома парами хромосом у каріотипі [1; 5; 6], що робить його зручним об'єктом для проведення каріологічних досліджень [7].

На сьогодні одним із перспективних напрямків збереження та відновлення генетичного різноманіття рослин є культура *in vitro*. Використання цього методу має багато переваг: незалежність від кліматичних умов, можливість використання мінімальної кількості експлантів для отримання стерильних культур без порушення природних популяцій, репродукція матеріалу, який важко розмножується традиційними методами, та можливість його тривалого зберігання в асептичних умовах [8; 9]. Основними факторами, які впливають на морфогенетичні процеси в культурі тканин і органів, є таксономічна приналежність, генетичні особливості та фізіологічний стан материнських рослин, тип експланту для ініціації калусоутворення, склад живильного середовища та умови вирощування [8; 10]. Головним завданням є вибір правильної методики культивування *in vitro*, яка дозволяє отримати велику кількість рослинного матеріалу, в тому числі рідкісних і зникаючих видів, із можливістю реінтродукції у природу. З іншого боку, індукція утворення калусу з подальшою регенерацією може сприяти утворенню генетично різних соматоклонів, що представляє інтерес для фундаментальної науки та розширення генетичного різноманіття.

У науковій літературі є небагато джерел, що стосуються клонального розмноження *in vitro* та одержання культури тканин *Z. bieber-*

© ТВАРДОВСЬКА М.О., КУНАХ В.А.

steiniana [7; 11; 12]. У 1970-х роках отримано культури *in vitro* та проведено їх цитогенетичний аналіз, у результаті якого встановлено, що суспензійна культура клітин та отримані з неї регенеранти *Z. biebersteiniana* характеризувалися низьким рівнем хромосомної мінливості, рослини-регенеранти були диплоїдними [7; 8]. Подальша розробка біотехнологічних підходів дасть можливість отримати достатню кількість рослинного матеріалу шляхом клонування *in vitro* для збереження та відновлення генетичного різноманіття, а також для подальших досліджень виду.

Метою роботи було введення в культуру *in vitro* *Z. biebersteiniana* для отримання асептичних проростків із наступною реінтродукцією в природне середовище, а також одержання культури тканин цього виду.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом для дослідження слугувало насіння *Z. biebersteiniana*, зібране у 2002 році поблизу с. Рахинка (49°00'51" пн. ш., 44°55'22" сх. д.). Введення цього виду в культуру *in vitro* ми розпочали в 2012 році.

Для отримання асептичних проростків насіння стерилізували за такою схемою: обробка розчином детергенту протягом 30 хв; промивання проточною водою протягом 30 хв; 2–3-кратне промивання дистильованою водою; поверхнева стерилізація 96% етанолом протягом 10 с; витримання у 5% розчині пероксиду водню протягом 40 хв; 2–3-кратне промивання стерильною дистильованою водою. Асептичне насіння висаджували в чашки Петрі на агаризоване живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) [13] з половинним вмістом макро- і мікро-солей (МС/2) без фітогормонів. Насіння пророщували за температури 16–18°C, освітлення 6500 люкс, відносної вологості повітря 55–65% і світлового дня тривалістю 16 год. Ефективність проростання визначали як відношення кількості пророслого насіння до загальної кількості висаджених насінин.

Отримані з насіння асептичні 1-місячні рослини поміщали в скляні посудини об'ємом 300 мл на агаризоване живильне середовище МС, доповнене 0,1 мг/л α -нафтилоцтової кислоти (НОК). Частину рослин *in vitro* згодом висаджували в горщики з ґрунтовою сумішшю.

Для індукції калюсоутворення в якості експлантів використовували корені, листки та ділянки точки росту пагона від асептичних про-

ростків *Z. biebersteiniana*, які висаджували на живильні середовища МС та Гамборга-Евелей (В₅) [14], доповнені різними концентраціями фітогормонів: 2,4-дихлорфеноксіцтової кислоти (2,4-Д), 6-бензиламінопурину (БАП) та кінетину (Кін).

Відсоток калюсогенезу (ВК) визначали через 6 тижнів після висадження експлантів:

$$BK = \frac{N_k}{N} \times 100 \%,$$

де ВК – відсоток калюсогенезу; N_k – кількість експлантів, на яких утворився калюс; N – кількість висаджених експлантів (враховували лише неінфіковані експланти).

Культури інкубували в темряві за температури 20–21°C, субкультивування проводили через кожні 4 тижні. Отримані дані опрацьовували статистично [15].

Результати та обговорення

Проростання насіння та отримання колекції рослин. Відомо, що ефективним методом введення в культуру *in vitro* є отримання асептичних рослин шляхом пророщення стерильного насіння. Перешкодою цьому може бути тип спокою насіння, ступінь його дозрівання, термін та умови зберігання, тривалість стратифікації, а також спосіб обробки.

Для стимулювання проростання насіння *Z. biebersteiniana* ми використали два фактори: дію позитивними низькими температурами (4–8°C) та обробку гібереловою кислотою (ГК₃). Перші спроби отримання рослин (2012 р.) дали змогу одержати лише два асептичні проростки. Слід відмітити, що насіння до початку проведення експериментів зберігали за кімнатної температури. Після цього його витримували в умовах позитивної низької температури упродовж 5–7 років. Під час повторного висадження насіння (2019 р.) відсоток проростання значно зріс і становив 57,3%. Припускаємо, що тривала холодова стратифікація сприяла підвищенню схожості його проростання. Аналогічні результати отримані й іншими дослідниками за введення в культуру *Z. biebersteiniana* [12]. ГК₃ також збільшувала відсоток проростання. Серед протестованих варіантів (концентрації – 300, 500 та 600 мг/л ГК₃, час обробки – від 10 до 24 год) оптимальним виявилось витримання насіння у ГК₃ з концентрацією 600 мг/л протягом 20 годин.

Важливим етапом в отриманні асептичних проростків є вибір стерилізувального агента та часу експозиції. Найоптимальнішим стерилізувальним агентом для *Z. biebersteiniana* у наших експериментах був 5% розчин перексиду водню з часом експозиції 40 хв. За використання такої схеми стерилізації та зазначених умов перші сходи з'являлися на 10–14 день після висадження насіння (рис. 1А).

Отримані асептичні проростки *Z. biebersteiniana* (рис. 1Б) висаджували у скляні посудини на агаризовані живильні середовища МС та В₅ з додаванням 0,1 мг/л НОК (рис. 1В). Клони вкорінювалися на 5–8 добу; відсоток вкорінення досягав 95%. Через 4–5 тижнів культивування висота пагонів становила 12–15 см. За цей період рослини заповнювали вегетативною масою усю культивацийну посудину. Далі їх розділяли на окремі пагони, які використовували для клонального розмноження *in vitro*.

Частину отриманих рослин *in vitro* *Z. biebersteiniana* висаджували в горщики з сумішшю ґрунт:вермикуліт:торф у співвідношенні 3:1:1 в умовах теплиці (рис. 1Г). Експерименти з

адаптації рослин до умов закритого ґрунту виявили високий рівень приживання рослин. Тривалість адаптації *Z. biebersteiniana* до сухості повітря та нестерильності субстрату складала в середньому 10 днів. Через два місяці після висадження на живильне середовище або у ґрунт рослини переходили до фази колосіння, яка завершувалася повним виходом колоска (рис. 2). Через 4–5 днів наставало цвітіння і припинення росту *Z. biebersteiniana*, що характерно для більшості злаків.

Рослини *Z. biebersteiniana* мали прямостоячі стебла заввишки 20–30 см; листки вузькі (1–4 мм), плоскі. Суцвіття – волоть із складними одноквітковими колосками на довгих і тоньких ніжках, які відхилялися від гілочок волоті (рис. 2В). Колоски містили зернівки розміром 0,8–1 мм та були густо покриті волосками. Такий тип суцвіття служить типовим пристосуванням виду до анемохорії за типом «перекотиполе» [1]. Рослини мають досить короткий час вегетації та значну кількість насінин з однієї рослини.

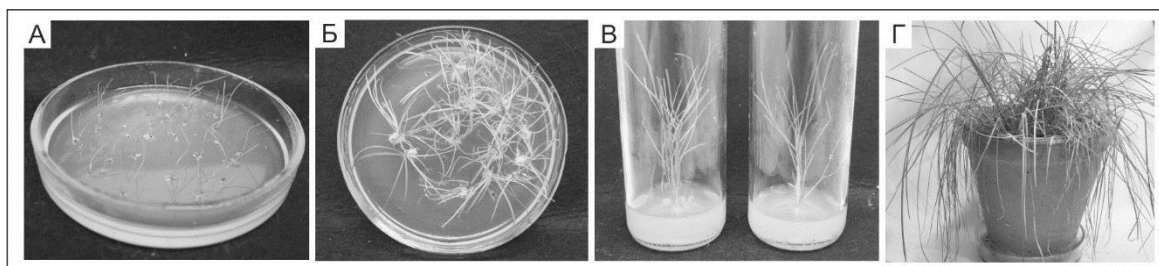


Рис. 1. Отримання асептичних проростків *Z. biebersteiniana* та їх перенесення у закритий ґрунт: А – проростання насіння; Б – асептичні проростки; В – рослини *in vitro* на середовищі МС, доповненому 0,1 мг/л НОК; Г – рослини в умовах закритого ґрунту.

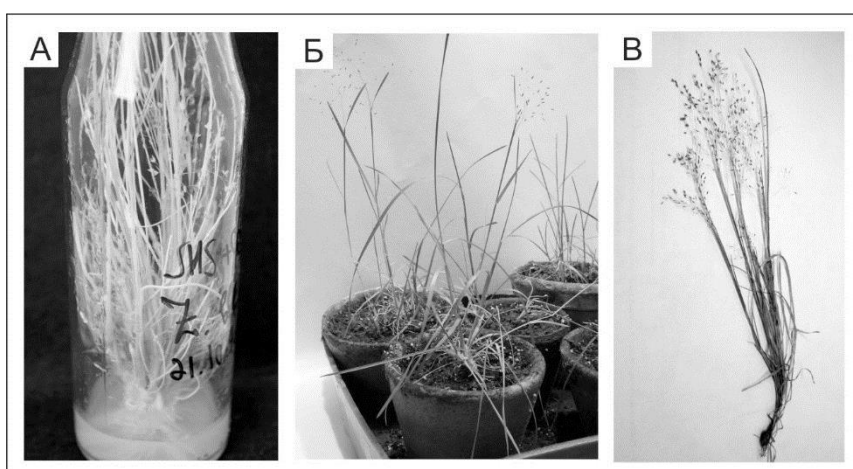


Рис. 2. Колосіння та цвітіння рослин *Z. biebersteiniana*: А – в умовах *in vitro*, Б – в умовах закритого ґрунту, В – суцвіття.

Ми отримали колекції рослин *Z. biebersteiniana* в умовах *in vitro* та в закритому ґрунті (рис. 3). Усі рослини колосилися, тому вдалося зібрати достатню кількість насіння, яке можна використати з метою інтродукції виду *ex situ*, а також для подальших досліджень.

Відомо, що у природі *Z. biebersteiniana* – це однорічна рослина з червневим закінченням життєвого циклу [2]. Вид може проростати як навесні, так і восени за середньодобової температури повітря 14°C, тому має два варіанти життєвого циклу – озимий і яровий. Цвітіння спостерігається за середньодобової температури 19–20°C [4].

Отримання культури тканин. Для індукції калусоутворення використовували експланти кореневого та листкового походження, а також ділянки точки росту пагона *Z. bieber-*

steiniana, які висаджували на чотири варіанти живильних середовищ:

- МС, доповнене 1,0 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л Кін;
- МС, доповнене 3,0 мг/л 2,4-Д та 0,2 мг/л БАП;
- В₅, доповнене 1,0 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л Кін;
- В₅, доповнене 2,0 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л БАП.

Використані живильні середовища характеризувалися різною здатністю індукувати процес калусоутворення у *Z. biebersteiniana* (рис. 4). Середовище В₅, доповнене 2,0 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л БАП, виявилось найефективнішим. Перші ознаки індукції калусоутворення з'явилися на 7–9 добу з часу закладання експерименту. Найбільша калусогенна активність (100%) була у точок росту пагона, тоді як на корневих та листкових експлантах цей показник становив 14,3% та 4,8% відповідно.

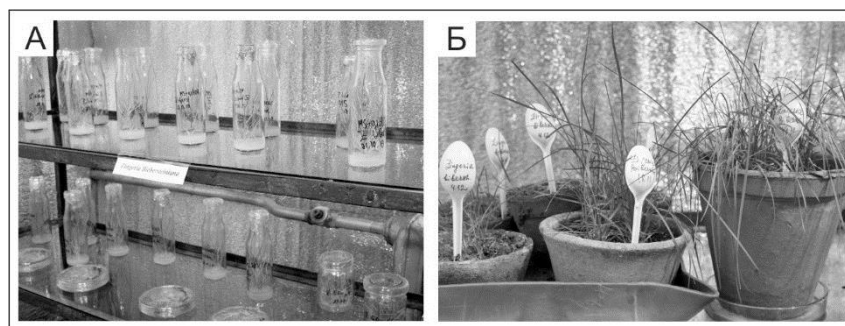


Рис. 3. Колекції рослин *Z. biebersteiniana*: А – *in vitro*, Б – у закритому ґрунті.

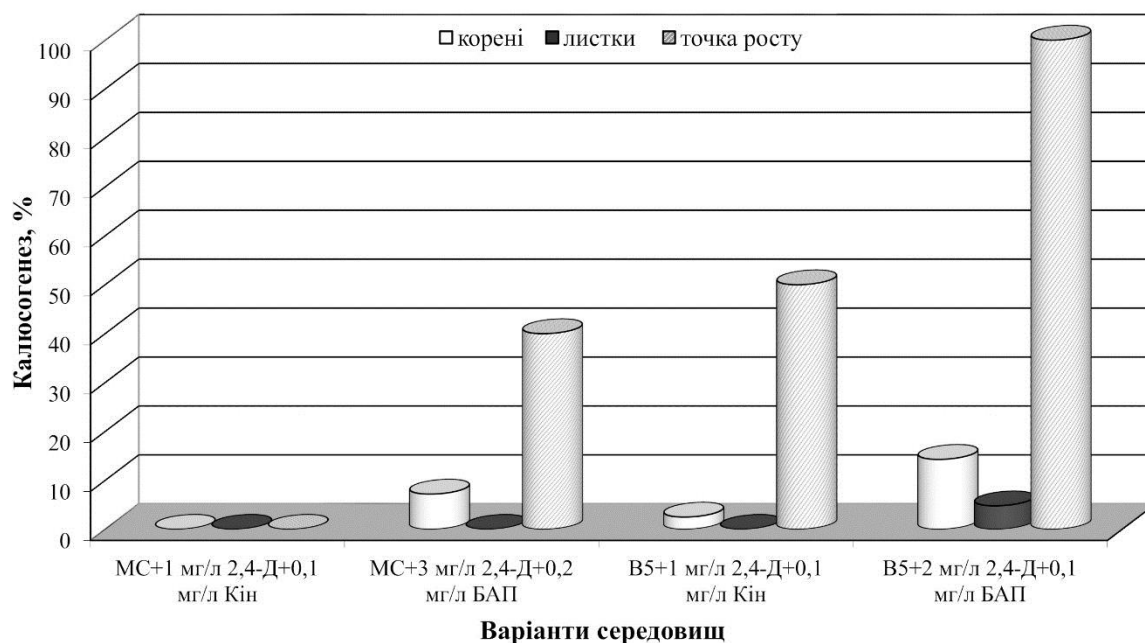


Рис. 4. Частота калусоутворення (%) з корневих, листкових експлантів та ділянок точки росту пагона рослин *Z. biebersteiniana* на різних варіантах живильних середовищ.

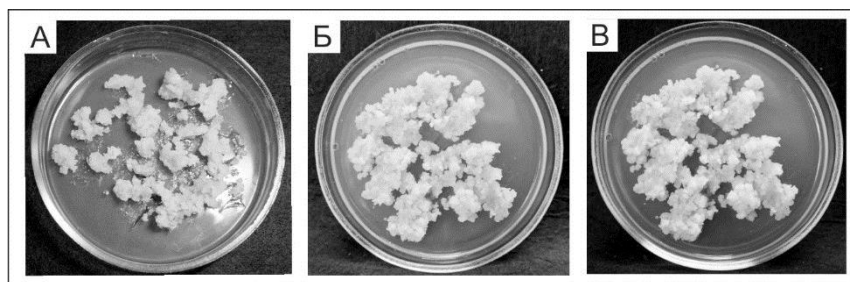


Рис. 5. Культура тканин *Z. biebersteiniana*, отримана з різних типів експлантів: А – листкових, Б – корневих, В – точки росту пагона.

На середовищі В₅, доповненому 1,0 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л Кін, формування калюсу було результативним на ділянках точки росту пагона (50%) та корневих експлантах (2,5%). Отриманий життєздатний та проліферативно активний калюс мав світло-жовте забарвлення та пухку консистенцію (рис. 5). Середовище МС, доповнене 3,0 мг/л 2,4-Д та 0,2 мг/л БАП, також забезпечувало індукцію калюсогенезу на ділянках точки росту пагона (40%) та корневих експлантах (7,2%), однак формування калюсу відбувалося повільніше (впродовж 3–4 тижнів). Жоден із використаних експлантів не ініціював калюсоутворення на середовищі МС, доповненому 1,0 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л Кін.

Підбираючи умови калюсоутворення, ми виявили залежність ефективності утворення та проліферації калюсу від мінерального складу живильного середовища, співвідношення і концентрації регуляторів росту, а також типу експланта.

Два середовища з різним мінеральним складом (В₅ та МС), але однаковою концентрацією одних і тих ж фітогормонів – 1,0 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л Кін по-різному впливали на процес калюсоутворення: на середовищі МС калюс взагалі не утворився, тоді як на В₅ вдалося отримати проліферативно активний калюс. Ймовірно, вища ефективність середовища В₅ для індукції калюсогенезу *Z. biebersteiniana* зумовлена нижчим вмістом у ньому деяких макро- та мікроелементів (азоту, кальцію, цинку, бору, мангану), а також сахарози (порівняно з середовищем МС). Очевидно, такий склад живильного середовища більше відповідає трофічним потребам виду.

Серед усіх протестованих співвідношень та концентрацій фітогормонів у середовищі найоптимальнішою була комбінація регуляторів росту 2,0 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л БАП. За таких умов відбувалося формування калюсу на усіх типах експлантів.

Для проліферації отриманий калюс відділяли від експлантів і висаджували на живильне середовище В₅, доповнене 2,0 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л БАП, яке мало найбільшу здатність підтримувати ріст калюсних тканин у тривало пасивованій культурі.

Усі протестовані нами варіанти живильних середовищ для отримання культури тканин *Z. biebersteiniana* містили 2,4-Д, оскільки відомо, що основною особливістю середовищ для індукції та подальшого культивування калюсів у злаків є високий вміст ауксинів, найчастіше 2,4-Д – до 10 мг/л. Так, для отримання та проліферації культури тканин різних сортів пшениці (*Triticum aestivum* L.) найкращим було середовище МС з концентрацією цього ауксину 2,5–6 мг/л у поєднанні з незначними концентраціями Кін (0,1–0,5 мг/л), що позитивно впливало на утворення калюсу [16]. У процесі введення в культуру *in vitro* *Z. biebersteiniana* деякими дослідниками для індукції калюсоутворення використане живильне середовище МС, доповнене 4 мг/л 2,4-Д [12], однак така висока концентрація ауксину виявилася неефективною для тривалого росту культури тканин, оскільки призводила до її швидкого некрозу. Зниження концентрації 2,4-Д до 0,1, 0,2 та 0,5 мг/л призводило до утворення калюсу світло-жовтого забарвлення на корневих експлантах [12].

Висновки

З'ясовано особливості та розроблено схему проростання насіння, клонального розмноження *in vitro*, індукції калюсоутворення з різних типів експлантів та тривалого вирощування культури тканин *Z. biebersteiniana*. Виявлена здатність насіння цього виду зберігати схожість навіть після 17 років зберігання. Встановлено ефективність порушення спокою насіння тривалими позитивними температурами (4–8°C упродовж 5–7 років) та обробкою ГК₃ (600 мг/л протягом 20 годин). З'ясовано, що для клонального

розмноження *in vitro* *Z. biebersteiniana* оптимальним є агаризоване живильне середовище МС, доповнене 0,1 мг/л НОК. Проведені експерименти з адаптації рослин до умов закритого ґрунту виявили високий рівень приживання рослин. Розроблено умови для ініціації та проліферації калюсу з корневих та листових експлантів, а також ділянок точки росту пагона. Встановлено, що частота калюсогенезу залежала від мінерального і фітогормонального складу живильного середовища, а також типу експланта. Найбільшою здатністю до калюсоутворення характеризувалися ділянки точки росту пагона. Найефективнішим для індукції калюсоутворення та три-

валого культивування калюсних тканин було живильне середовище В₅, доповнене 2 мг/л 2,4-Д та 0,1 мг/л БАП. Запропоновані способи культивування *in vitro* *Z. biebersteiniana* можуть бути використані для збереження та розширення генетичного різноманіття виду, а також для одержання достатньої кількості рослинного матеріалу для подальших досліджень.

Робота виконана в рамках бюджетної теми НАН України «Генетичні та фізіолого-біохімічні механізми адаптації рослин до екстремальних умов довкілля» (2021–2025), номер державної реєстрації 0120U105249.

Висловлюємо щирі вдячність усім відважним захисникам України, чий героїчні подвиги проти російського вторгнення дозволили завершити цю статтю.

References

1. Tzvelev N.N. Zlaki SSSR. Leningrad: Nauka Publishers, 1976. 341 s. [in Russian]
2. Red Book of Ukraine. Plant Kingdom. Ed. Ya.P. Didukh. Kyiv: Global Konsalting, 2009. 900 s. [in Ukrainian]
3. Golubev V.N. "Pulsating" elements of regional floras. *Bull. Nikit. Bot. Garden*. 2004. Is. 90. P. 8–12. [in Russian]
4. Nikiforov A.R., Korzenevsky B.B. Biological peculiarities and structure of plants of *Zingeria biebersteiniana* (Claus) P. Smirn. (*Poaceae*). *Ukr. Bot. Journ.* 2010. Vol. 67 (5). P. 650–654. [in Russian]
5. Cremonini R. Low chromosome number angiosperm. *Caryologia*. 2005. Vol. 58 (4). P. 403–409.
6. Rodionov A.V., Kim E.S., Punina E.O., Machs E.M., Tyupa N.B., Nosov N.N. Evolution of chromosome numbers in the tribes *Aveneae* and *Poeae* inferred from the comparative analysis of the internal transcribed spacers ITS1 and ITS2 of nuclear 45S rRNA genes. *Bot. Zhurn.* 2007. Vol. 92 (1). P. 57–71. [in Russian]
7. Levenko B.A., Yurkova G.N., Kunakh V.A., Zosimovich V.P. Malokhromosomnyy zlak *Zingeria* – novyy model'nyy ob'yekt dlya kultury kletok i tkaney rasteniy. *Doklady AN SSSR*. 1976. Vol. 228 (1). P. 209–210. [in Russian]
8. Kunakh V.A. Biotechnology of medicinal plants. Genetic, physiological and biochemical basis. Kyiv: Logos, 2005. 724 s. [in Ukrainian]
9. Hussain A., Qarshi I.A., Hummera N., Ullah I. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. 2012. doi: 10.5772/50568.
10. da Silva A.L.L., Horbach M.A., Brondani G.E., Walter J.M., Dos Santos L.F., Habibi P., Araújo J.F., Kielse P. Applications of micropropagation in plant biotechnology. In book: *Micropropagation: Methods and Effects*. Publisher: Nova Science Publishers, Inc. 2019. P. 1–24.
11. Petrova T.F., Kulinich A.V., Abramova V.M. *In vivo* and *in vitro* cultivation of *Zingeria biebersteiniana* 2n equals 4 as a model genetic object. *Doklady Akademii Nauk SSSR*. 1991. 319 (4). P. 989–991. [in Russian]
12. Khromov A.V., Cherednichenko M.Yu. *In vitro* culture of *Zingeria biebersteiniana* (Claus) P. Smirn as a method of conservation and expanding its biodiversity. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 2022. 981. 042070. doi:10.1088/1755-1315/981/4/042070.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15 (13). P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
14. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 1968. Vol. 46 (5). P. 417–421. doi: 10.1139/o68-063.
15. Lakin G.F. Biometrics: Textbook for biological specialties of universities. Moscow : Higher school, 1980. 293 s. [in Russian]
16. Saja J.Sh. *In vitro* study of the callus induction of two varieties of wheat seeds by plant growth regulators. *J. Biochem. Cell. Arch.* 2018. Vol. 18 (2). P. 2067–2071. doi: 10.3923/aj.2018.67.71.

TWARDOVSKA M.O., KUNAKH V.A.

Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150

IN VITRO CULTURE OF ZINGERIA BIEBERSTEINIANA (CLAUS) P. SMIRN. AS A METHOD FOR CONSERVATION AND RESTORATION OF GENETIC DIVERSITY

Aim. The aim of the work was to determine the conditions for development of *in vitro* culture, induction of callus formation, and long-term tissue culture of *Zingeria biebersteiniana* (Claus) P. Smirn. **Methods.** *In vitro* clonal propagation, tissue culture techniques. **Results.** The seed germination rate was found to increase significantly after long-term cold stratification. The protocol for seed sterilization was developed, which yielded 57.3% of aseptic plants. Collections of *in vitro* and pot cultured plants were created. Experiments on the adaptation of *in vitro* propagated plants to pot culture conditions revealed a high level of their survival. The optimal medium for *in vitro* clonal propagation was

MS, supplemented with 0.1 mg/L NAA; while the most effective media for induction of callus formation and for long-term tissue culture was B₅ supplemented with 2 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BAP. **Conclusions.** The protocols and conditions for seed germination, *in vitro* clonal propagation, induction of callus formation, as well as long-term tissue culture of *Z. biebersteiniana* have been developed. The developed techniques of *in vitro* culture can be used for conservation and restoration of genetic diversity of the species, as well as to obtain sufficient plant material for further studies.

Keywords: *Zingera biebersteiniana* (Claus) P. Smirn., seed germination, *in vitro* plants, callus induction, tissue culture.