

ЕФЕКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВОЇ СТЕРИЛІЗАЦІЇ НАСІННЯ ЯК ВАЖЛИВА УМОВА СТВОРЕННЯ *IN VITRO* КОЛЕКЦІЙ РОСЛИН, ЩО ОХОРОНЯЮТЬСЯ

Із загальної кількості видів рослин, яка сягає за різними оцінками від 250 до 500 тисяч, приблизно 150 вирощуються комерційно як сільськогосподарські культури; близько 10 тисяч видів мають застосування у народній та офіційній медицині [1, 2]. Генетична основа більшості культурних рослин становить менше 10 % від загального генофонду, тому носіями генетичного різноманіття є дикорослі споріднені види, які часто використовуються як джерело генетичного матеріалу для підвищення якості та врожайності культивованих рослин або для збільшення стійкості до захворювань та шкідників, до посухи, засолення та інших абіотичних стресів. Ціла низка факторів, зокрема, кліматичні або інші зміни довкілля та непродумана господарська діяльність людини, призводять до поступового зменшення біорізноманіття рослин та ризику втрати генетичної варіабельності культивованих видів. Разом з тим зростає усвідомлення необхідності застосування широкого спектра засобів для збереження біорізноманіття, навіть незважаючи на те, чи має той або інший конкретний вид рослин сьогодні практичну цінність. Такі засоби включають збереження *in situ* (в природних умовах) та *ex situ* (в польових колекціях, банках насіння, асептичних колекціях *in vitro* або за допомогою кріоконсервації) [3].

Методи *in situ* передбачають збереження видів у складі природних екосистем шляхом створення природо-заповідного фонду. В наш час, згідно з Загальнодержавною програмою збереження біорізноманіття України на 2007–2025 роки, до складу природо-заповідного фонду України входить більш як 7608 територій та об'єктів загальною площею в 3,2 млн гектарів, що становить 5,4 % загальної площі України. Зважаючи на те, що Україна володіє близько 35 % від всього біорізноманіття Європи, займаючи при цьому 6 % її площі, така частка природоохоронних територій є недостатньою для розв'язання проблем скорочення біорізноманіття. Протягом останніх десятиріч спостерігається тенденція до збільшення кількості видів рослин, що заносяться до

Червоної книги України та до списків регіональної охорони, тому слід застосовувати та розвивати також методи збереження рослин *ex situ* [4].

Використання методів біотехнології, зокрема культури *in vitro*, є доцільним у випадках, коли рослинний матеріал не може зберігатися у вигляді насіння, або коли чисельність виду є катастрофічно низькою. При цьому застосування біотехнологічних підходів дає змогу скоротити витрати та обсяг територій по збереженню видів у порівнянні, наприклад, з вирощуванням у ботанічних садах та теплицях. Методи культури *in vitro* дають змогу зберігати види рослин із утрудненим розмноженням; проводити біохімічні, фізіологічні та генетичні дослідження рослин, які перебувають на межі зникнення; унеможливають ураження захворюваннями та комахами та дають вихідний матеріал, вільний від грибкових, вірусних та бактеріальних захворювань. При залученні невеликої кількості вихідних особин ці методи дають змогу отримати досить високий коефіцієнт розмноження навіть для видів, що погано піддаються розмноженню *in situ* та *ex situ* незалежно від погодних та кліматичних умов. Отже, створення *in vitro* колекцій видів флори України, що охороняються, є важливим та актуальним завданням, що не лише може допомогти зменшити кількість видів, які заносяться до Червоної книги України, а й у подальшому збільшити та відновити їх чисельність та, можливо, поповнити списки рослин, що є джерелами біологічно активних речовин або цінним генетичним матеріалом. В основі технології збереження *in vitro* лежать методи мікроклонального розмноження, першим етапом якого є введення в асептичну культуру насіння або вегетативних органів рослин із застосуванням процедур поверхневої стерилізації.

Матеріали і методи

В якості вихідних експлантів було використано насіння ряду видів дикорослої флори України, які належать до різних таксономічних груп, мають різний природоохоронний статус та занесені до Червоної книги (табл. 1) [5]. Більшість об-

Види рослин, що були використані в роботі

Родина	Вид	Охоронний статус
Asteraceae	<i>Ligularia sibirica</i> (L.) Cass	Вразливий
	<i>Saussurea discolor</i> (Willd.) DC.	Зникаючий
Brassicaceae	<i>Crambe tataria</i> Sebeek var. <i>pinnatifida</i> (W.T.Aiton)	Вразливий
	<i>Crambe koktebelica</i> (Junge) N. Busch	Рідкісний
Caprifoliaceae	<i>Lonicera caerulea</i> L.	Рідкісний
Fabaceae	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Неоцінений
Iridaceae	<i>Iris sibirica</i> L.	Вразливий
Papaveraceae	<i>Glaucium flavum</i> Crantz	Вразливий
Dipsacaceae	<i>Cephalaria demetrii</i> Bobrov	Зникаючий

раних рослин можуть бути потенційним джерелом речовин з біологічною активністю, оскільки існує низка публікацій про ці види, або споріднених представників того ж самого роду, як продуцентів біологічно активних сполук [6–8].

Насіннєвий матеріал *Ligularia sibirica* (L.) Cass, *Saussurea discolor* (Willd.) DC. та *Pinus cembra* L. було зібрано та люб'язно надано співробітниками Національного природничого парку Черемоський (Чернівецька область, Путильський р-н, Чивчинські гори, хребет Чорний Діл, г. Великий Камінь) А.В. Юзиком та О.П. Томнюк. Насіннєвий матеріал *Crambe koktebelica* (Junge) N. Busch та *Cephalaria demetrii* Bobrov був зібраний співробітником Національного науково-природничого музею НАН України (Крим, гірський масив Карадаг) М.С. Калістою. Зразки насіння інших видів були взяті з банку *ex situ* Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ.

Введення насіння в культуру *in vitro* проводили згідно з загальноприйнятими рекомендаціями [9] та намагались оптимізувати для кожного із обраних видів. У ході роботи використовували наступні стерилізуючі сполуки: промисловий розчин «Білизна», діюцид та 3 % перексид водню. На початку роботи насіння промивали під стічною водою протягом кількох хвилин та поміщали у 70 %-й етанол на 60 с. Далі зразки насіння занурювали у розчини зазначених сполук: «Білизна» (час експозиції 4–12 хв), діюцид (1–6 хв), або 3 % H_2O_2 (4–12 хв). Після стерилізації проводилась промивка експлантів стерильною дистильованою водою тричі по 5 хв. Далі насіння переносили в чашки Петрі на агаризоване поживне середовище MS [9] та інкубували при 16-годинному фотоперіоді та температурі +24 °С. Для кожного виду рослин та способу поверхневої стерилізації визначали відсоток асептичного насіння відносно до загального числа вихідних насінин (ефективність стерилізації) та відсоток насіння,

яке після обробки стерилізуючими сполуками утворювало життєздатні паростки (ефективність проростання).

Результати та обговорення

Результати поверхневої стерилізації насіння обраних видів наведені на рис. 1. Найкращі показники асептичності насіння було отримано при застосуванні діюциду. Відсоток асептичного насіння в цьому випадку в середньому сумарно для всіх дослідних видів становив 92 %, а відсоток насіння, що утворило проростки – 57 %. При використанні інших стерилізуючих сполук ці показники були значно нижчими. При застосуванні «Білизни» ми отримали в загальному 52 % асептичного насіння, з якого 17 % утворило життєздатні проростки; при використанні 3 % H_2O_2 відсоток асептичного насіння в середньому становив – 71 %, з них лише 6,5 % утворили про-

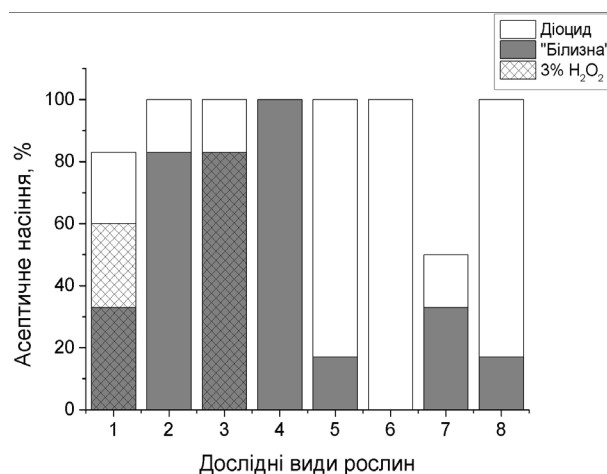


Рис. 1. Асептичність насіння після застосування різних стерилізуючих сполук: 1 – *Iris sibirica*, 2 – *Lonicera caerulea*, 3 – *Crambe tataria* var. *pinnatifida*, 4 – *Saussurea discolor*, 5 – *Ligularia sibirica*, 6 – *Glaucium flavum*, 7 – *Crambe koktebelica*, 8 – *Cephalaria demetrii*

ростки. Найкращі результати по стерилізації діюцидом було отримано для *Ligularia sibirica* – 100 % асептичного насіння, з яких 83 % утворили проростки. При стерилізації «Білізною» найкращі результати були для насіння двох видів – *Iris sibirica* та *Crambe koktebelica* (33 % асептичного насіння, з якого 50 % утворили життєздатні проростки). При використанні 3 % H_2O_2 найкращі результати знову були отримані для насіння *Ligularia sibirica* (60 % асептичного насіння, з нього 13 % утворило проростки). Найгірше відреагував на обробку діюцидом *Glaucium flavum* (при 100 % асептичності отриманого матеріалу лише 10 % проросли). На стерилізацію «Білізною» найгірше відреагувало насіння *Ligularia sibirica* та *Cephalaria demetreei* (17 % асептичності отриманого матеріалу, з яких не вдалося отримати життєздатних проростків) (рис. 2).

Для *Iris sibirica* час експозиції насіння у стерилізуючій сполуці (діюцид) становив 4 хв, для *Lonicera caerulea* – 3 хв, *Crambe tataria* – 4 хв, *Saussurea discolor* – 4 хв, *Ligularia sibirica* – 6 хв, *Glaucium flavum* – 4 хв, *Crambe koktebelica* – 4 хв, *Cephalaria demetreei* – 3 хв. При проведенні скарифікації (повного видалення зовнішнього шару насіння) час експозиції насіння у стерилізуючій сполуці було зменшено, для *Crambe tataria* до 2–3 хв, для *Saussurea discolor* до 2 хв, *Crambe koktebelica* до 3 хв, для *Ligularia sibirica* – до 3 хв. Це також призводить до зменшення інкубаційного терміну проростання асептичного насіння. Таким чином, було встановлено, що використання діюциду у поєднанні із попередньою скарифікацією насіння забезпечує найбільшу кількість життєздатних асептичних проростків.

Для кожного виду інкубаційний період проростання насіння був різним. Для деяких видів була застосована попередня скарифікація насіння перед стерилізацією для прискорення проростання; при цьому час експозиції скарифікованого насіння у стерилізуючій сполуці зменшували (*Crambe tataria* – 2–3 хв, *Saussurea discolor* – 2 хв, *Crambe koktebelica* – 3 хв, для *Ligularia sibirica* – 3 хв). Проростки *Iris sibirica* починали з'являтися на 28-й день після стерилізації, *Lonicera caerulea* – на 26-й день, *Crambe tataria* var. *Pinnatifida* – на 42-й день, *Saussurea discolor* – на 12-й день, *Ligularia sibirica* – на 16-й день, *Crambe koktebelica* – на 23-й день, *Cephalaria demetreei* – на 31-й день. Насіння *Glaucium flavum* проросло лише після інкубації на живильному середовищі, яке містило гіберелову кислоту (1

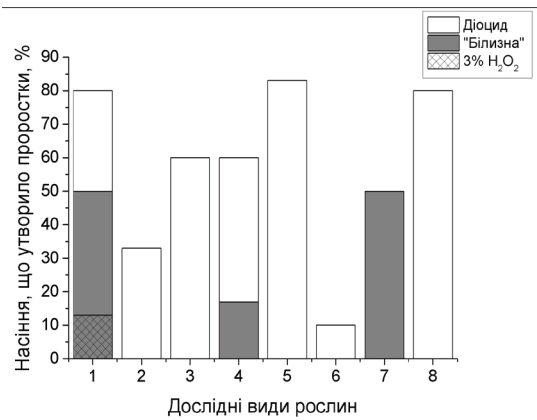


Рис. 2. Ефективність проростання насіння після застосування різних стерилізуючих сполук: 1 – *Iris sibirica*, 2 – *Lonicera caerulea*, 3 – *Crambe tataria* var. *pinnatifida*, 4 – *Saussurea discolor*, 5 – *Ligularia sibirica*, 6 – *Glaucium flavum*, 7 – *Crambe koktebelica*, 8 – *Cephalaria demetreei*

мг/л), на 20-й день після модифікації живильного середовища.

Кількісні результати ефективності проростання в різних варіантах поверхневої стерилізації наведено на рис. 2.

Проростки, що сформувалися в результаті проростання насіння (рис. 3), вирощували в стандартних умовах культуральної кімнати при 16-годинному фотоперіоді та 24 °C на агаризованих живильних середовищах.

Склад живильних середовищ оптимізували для проростків різних видів. Так, проростки *Lonicera caerulea* добре розвивались на середовищі MS без модифікацій, а у випадку *Saussurea discolor* для припинення швидкого почорніння проростка, що виникало через кілька днів після проростання, та для подальшого нормального розвитку було необхідним зменшення вмісту в живильному середовищі сахарози та макро- і мікросолей (MS/2). Вже через 7 днів після перенесення на поживне середовище MS/2 проростки мали вже по 2 листочки, а на 30–34 день культи-

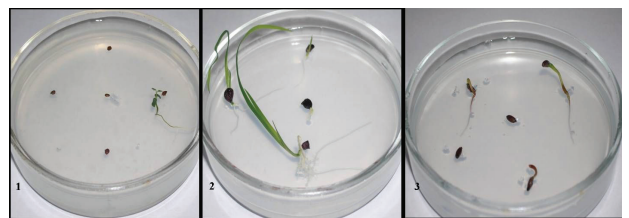


Рис. 3. Проростання насіння в асептичних умовах: 1 – *Lonicera caerulea* L., 2 – *Iris sibirica* L., 3 – *Cephalaria demetreei* Bobrov

вування утворювався корінь, і далі рослина розвивалася нормально. Сприятливий вплив на ріст проростків *Ligularia sibirica* становила нафтилоцтова кислота (НОК) в концентрації від 0,5 до 1 мг/л, у той час як при додаванні 0,5 мг/л НОК у живильне середовище проростки *Crambe tataria* та *Crambe koktebelica* погано розвивались, починала утворюватись калюсна тканина в місці контакту з середовищем. Вивчення культуральних потреб рослин кожного виду та визначення оптимальних живильних середовищ є необхідною умовою розробки ефективних протоколів розмноження *in vitro*.

Висновки

Таким чином, визначено оптимальні схеми поверхневої стерилізації насіння для обраних видів рослин, досліджено динаміку його проростання при використанні різних стерилізуючих сполук. При обмеженій кількості насіння, що нерідко має місце в роботі з рослинами, що охороняються, вдалий підбір типу стерилізуючої сполуки та тривалості обробки забезпечує оптимальний баланс між ступенем асептичності матеріалу та його життєздатністю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Béner A. Preservation of plant genetic resources in the biotechnology era. // *Biotechnol. J.* – 2006. – 1. – P. 1393–1404.
2. McChesney J.D., Venkataraman S.K., Henri J.T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? // *Phytochemistry.* – 2007. – 68. – P. 2015–2022.
3. Belokurova V.B., Kuchuk N.V. «*In vitro* bank and seed collection of wild-growing plants as a tool for plant conservation and utilization in biotechnological studies». «*Biotechnology and Plant Breeding Perspectives*» (eds. R.K. Behl and E. Arseniuk) / *Agrobios (International)* ISBN 978-93-81191-04-0. – Printed in India by Babloo Offset Jodhpur, 2014. – P. 219–232.
4. Сытник К.М. Биотическое разнообразие: его изучение, сохранение и обогащение // *Альгология.* – 2010. – 20, № 3. – С. 368–382.
5. Червона книга України. Рослинний світ [ред. Я.П. Дідух]. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
6. Марченко М.М., Шелифіст С., Чебан Л.М. Властивості секвітерпенових лактонів культивованих *in vitro* *Saussurea discolor* (Willd.)DC. та *S. Porcii* Degen // *Biotechnologia Acta.* – 2014. – 7, N 2. – P. 86–92.
7. Bernardi R., Finguerra M.G., Rossi, Palmieri A.A. Isolation and Biochemical Characterization of a Basic Myrosinase from Ripe *Crambe abyssinica* Seeds, Highly Specific for *epi*-Progoitrin // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – 51. – P. 2737–2744.
8. Jian-Qun Liu, Mian Zhang, Chao-Feng Zhang, Huan-Yang Qi, Alan Bashall, Annie Bligh S.W., Zheng-Tao Wang Cytotoxic sesquiterpenes from *Ligularia platyglossa* // *Phytochemistry.* – 2008. – 69. – P. 2231–2236.
9. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наукова думка, 2005. – 269 с.

PUSHKAROVA N.O., BELOKUROVA V.B., KUCHUK M.V.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148, e-mail: pushkarovan@mail.ua

SEED SURFACE STERILIZATION EFFICIENCY AS AN IMPORTANT PREREQUISITE IN FORMATION OF ENDANGERED PLANT SPECIES *IN VITRO* COLLECTIONS

Aims. Methods of *in vitro* conservation offer a number of advantages for endangered species preservation. The aim of this research was to elaborate efficient protocols of seed surface sterilization for several plant species of the Red Book of Ukraine taking into account the limited quantity of starting plant material. **Methods.** Comparison of surface sterilization methods using different antiseptic compounds has been carried out in combination with some stratification approaches. **Results.** For eight endangered plant species the efficient protocols of surface sterilization were elaborated. **Conclusions.** The influence of different antiseptic compounds on plant seed germination and the ways of improvement the surface sterilization process are shown.

Keywords: threatened species, biological diversity, seed surface sterilization.