

БІОТЕХНОЛОГІЯ ЗБЕРЕЖЕННЯ ДИКОРОСЛОЇ ОРХІДЕЇ ФЛОРИ УКРАЇНИ *Ophrys sphegodes* subsp. *mammosa* (Desf.) Soó ex E. Nelson

О. А. Шейко
І. В. Косаківська

Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного
НАН України, Київ

E-mail: lenasheyko@mail.ru

Отримано 14.05.2015

Метою роботи було визначення оптимальних умов калюсоутворення в культурі *in vitro* із насінневих зачатків, зав'язей і пиляків дикорослої зникаючої орхідеї *Ophrys subsp. mammosa* (Desf.) Soó ex E. Nelson з наступним використанням отриманих калюсних тканин для розроблення технології клонального мікророзмноження і збереження *ex situ*. У дослідженнях використовували біотехнологічні (культивування експлантів в умовах *in vitro*) і мікроскопічні (виготовлення тимчасових препаратів, світлова мікроскопія, цитоморфологічний аналіз калюсних тканин) методи. Підбрано живильні середовища з оптимальними концентраціями регуляторів росту й одержано калюсні культури з генеративних органів (для зав'язей — середовище Мурасіге–Скуга з додаванням 2,5 мг/л 6-БАП і 1,5 мг/л 2,4-Д; насінневих зачатків — середовище Ніча і Ніч з 2,0 мг/л 6-БАП і 2,5 мг/л 2,4-Д; експлантів пиляків — середовище Ніча і Ніч з 3 мг/л 6-БАП та 2,5 мг/л ІОлК). Цитоморфологічним аналізом виявлено в калюсах меристематичні осередки, поява яких свідчить про початок процесів вторинної диференціації в калюсних тканинах. Одержані результати використовуватимуть у подальших дослідженнях для одержання з калюсів рослин-регенерантів *O. sphegodes*.

Ключові слова: *Ophrys sphegodes*, культура *in vitro*, калюсогенез, фітогормони.

В останні роки поряд із застосуванням традиційних методів збереження й відновлення рідкісних і зникаючих видів рослин активно розробляють і впроваджують нові біотехнологічні підходи, серед яких чільне місце посідає метод мікроклонального розмноження. Однак через відсутність даних щодо морфогенезу в культурі *in vitro* та умов культивування, які б враховували індивідуальні реакції окремого виду, цей метод використовують обмежено [1, 2].

Дикорослі види родини *Orchidaceae* Juss., чисельність яких катастрофічно зменшується, занесено до Червоної книги України [3, 4]. Орхідея *O. sphegodes* належить до багаторічних трав'янистих рослин, які розмножуються насінням. Характеризується незадовільним ступенем природного відновлення, занесена до Бернської конвенції (додатки) та Конвенції про міжнародну торгівлю видами дикої фауни і флори, що перебувають під загрозою зникнення (CITES) [3, 4]. Потребує додержання режиму абсолютної заповідності, на території України трапляється в Гірському Криму. Охороняється в Кримському «Мис Март'ян» і Ялтинському гірсько-лісовому природних

заповідниках. Популяції ізольовані, малочисельні, складаються з поодиноких рослин або невеликих груп. Чисельність популяцій швидко скорочується [3–5].

Мета роботи полягала у визначенні оптимальних умов для калюсоутворення в культурі *in vitro* із насінневих зачатків, зав'язей і пиляків дикорослої зникаючої орхідеї *O. sphegodes* з наступним використанням отриманих калюсних тканин для розроблення технології клонального мікророзмноження і збереження *ex situ*.

Матеріали і методи

Визначення морфогенетичного потенціалу природного рослинного матеріалу в умовах *in vitro* проводили на насінневих зачатках, зав'язі та пиляках *O. sphegodes* (рис. 1). Експланти відбирали на початку цвітіння (пиляки) та 25-й день після запилення (зав'язі й насінневі зачатки).

Морфогенетичні потенції відібраних експлантів досліджували на живильних середовищах Мурасіге–Скуга для зав'язей та Ніча і Ніч (рН 5,6–5,8) для насінневих зачатків і пиляків [1, 6].

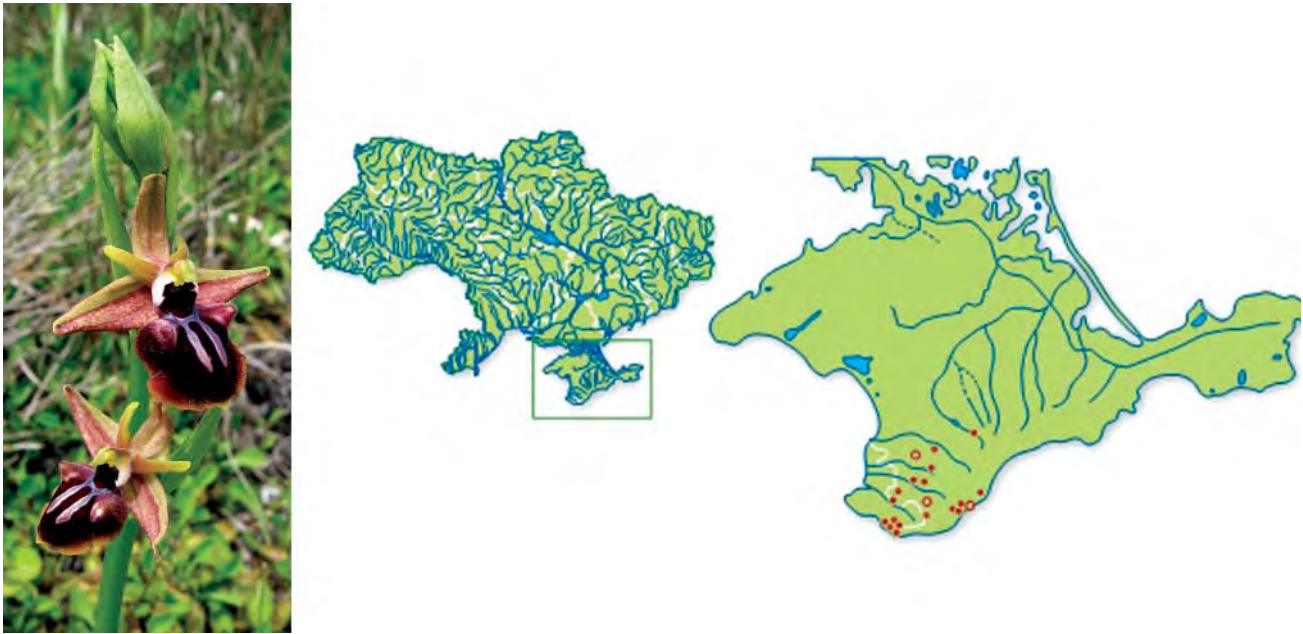


Рис. 1. Загальний вигляд *Ophrys sphegodes* і розповсюдження в Україні (позначено червоним)

Для приготування твердих живильних середовищ використовували 7–8 г/л агар-агару фірми «МЗХР» (РФ, Барнаул). Агар розчиняли безпосередньо перед використанням у половинному об'ємі дистильованої води, після чого додавали до середовища. Оскільки морфогенез регулюється певними співвідношеннями екзогенних фітогормонів цитокінінів та ауксинів [7–9], як основні фактори дедиференціації застосовували індолілмасляну кислоту (ІМК), 2,4-дихлорфеноксіцтову кислоту (2,4-Д) та 6-бензиламінопурин (6-БАП) у концентраціях від 0,5 мг/л до 3,0 мг/л (таблиця).

Розчини регуляторів росту готували з розрахунку 1 мг на 1 мл. Спочатку 6-БАП розчиняли в невеликій кількості 1 н NaOH, ауксини (ІМК, 2,4-Д) — в 0,1 мл етанолу і доводили до необхідного об'єму дистильованою водою. Розчини регуляторів росту зберігали за температури $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ не більше 7 діб.

Усі маніпуляції з ізольованими тканинами (введення в культуру, пересадження на свіже живильне середовище) виконували стерильними інструментами в асептичному приміщенні — ламінарному боксі GELAIRE TC 48 (ФРН). Чистий посуд, попередньо загорнутий у папір або фольгу, інструменти,

Варіанти співвідношень екзогенних регуляторів росту в живильних середовищах культивування надземних органів *Ophrys sphegodes in vitro*

Варіант живильного середовища	Вміст екзогенних регуляторів росту, мг/л		
	6-бензиламінопурин	2,4-дихлорфеноксіцтова кислота	індолілмасляна кислота
контроль	–	–	–
II	0,5	–	–
III	1,5	1,5	1,5
IV	2,0	1,5	–
V		–	2,0
VI		2,5	–
VII		3,0	–
VIII	2,5	1,5	–
IX		–	3,0
X	3,0	–	2,0
XI		–	2,5

папір, вату стерилізували в сушильній шафі LP-301 (Угорщина) за температури 160 °C упродовж 1,5–2 год. Живильні середовища стерилізували в автоклаві за температури від 120 °C до 135 °C під тиском 0,75–1 атм протягом 30 хв.

Стерилізацію пиляків проводили у 70% C_2H_5OH упродовж 1 хв, для зав'язей застосовували подвійну стерилізацію у 80% C_2H_5OH (1,5 хв) із додаванням 15% H_2O_2 (2 хв). Насінневі зачатки стерилізували у 70% C_2H_5OH (2 хв) разом із 15% H_2O_2 (3 хв). Для одержання асептичної культури частину рослини, з якої брали експлант, промивали водою з милом, змивали чистою водою, після чого стерилізували в розчинах дезінфікувальних речовин. До стерилізуючого розчину додавали емульгатор Твін-20. Після витримування експлантів у дезінфікувальних речовинах їх багаторазово промивали в дистильованій воді. Поверхневі шари клітин на зрізах, які могли зазнати пошкоджень під час стерилізації, видаляли.

Експланти вирощували в культуральній кімнаті, де підтримували постійну температуру в межах 20–25 °C, 16-годинний фотоперіод з освітленням 1 000–3 000 лк і відносну вологість повітря 70%. Культивування отриманих з експлантів калюсних тканин проводили у фотолюміністаті ФСЛ-В (РФ) за таких самих умов, як і для експлантів.

Мікроскопічні дослідження здійснювали на мікроскопах МББ-1 (РФ) (збільшення $\times 8$; $\times 20$; $\times 90$), використовуючи біокуляр БМ-51-2 (РФ). Мікрофотографії зроблено за допомогою фотонасадки МФН-11 (РФ) на фотоплівку Kodak-200.

Усі одержані результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерної статистичної програми Excel ліцензійного пакета Microsoft Office 2007. У таблиці і на рисунках подано середні арифметичні та їхні статистичні похибки. Достовірність різниці оцінювали за критерієм Стьюдента, використовуючи 5% -й рівень значущості ($P \leq 0,05$).

Результати та обговорення

Сучасні біотехнології дають змогу використовувати як експланти будь-який орган інтактної рослини, однак при цьому слід враховувати генотип, фізіологічний стан та фазу онтогенезу інтактної рослини, а також походження тканини експланта, її розмір і локалізацію [1, 8, 9]. У наших дослідженнях експлантами слугували генеративні органи *O. sphegodes*: пиляки, насінневі зачатки та зав'язі, яким притаманна певна автономність (рис. 2).

Важливу роль в індукції поділу клітин експланта, утворенні калюсу та морфогенезі відіграють регулятори росту. Оптимальний вміст екзогенних регуляторів росту є необхідною умовою одержання калюсу, органів рослин, ембріодів та регенерації рослин загалом. Індивідуальний характер синтезу ендогенних фітогормонів рослинними тканинами зумовлює широку варіабельність реакцій на зовнішні гормональні фактори. Тому успішне культивування рослинних експлантів різного походження потребує ретельного підбору концентрацій і співвідношень фітогормонів у живильному середовищі [10–13].

Нашими дослідженнями було встановлено, що максимальна частота проліферації зав'язей *O. sphegodes* спостерігається за культивування на середовищах з додаванням 2,5 мг/л 6-БАП і 1,5 мг/л 2,4-Д (частота проліферації становила $19,1 \pm 0,4\%$) і 3 мг/л 6-БАП та 2,0 мг/л ІОЛК ($19,9 \pm 0,5\%$) (рис. 3). Під час культивування насінневих зачатків найбільший відсоток калюсоутворення спостерігали у разі додавання в живильне середовище 2,0 мг/л 6-БАП і 2,5 мг/л 2,4-Д ($37,2 \pm 0,4\%$). Максимальне калюсоутворення з експлантів пиляків фіксували за додавання 3 мг/л 6-БАП та 2,5 мг/л ІОЛК ($40,4 \pm 0,5\%$).



Рис. 2. Культура *in vitro* експлантів із зав'язей (А), насінневих зачатків (Б) і пиляків (В) *Ophrys sphegodes*

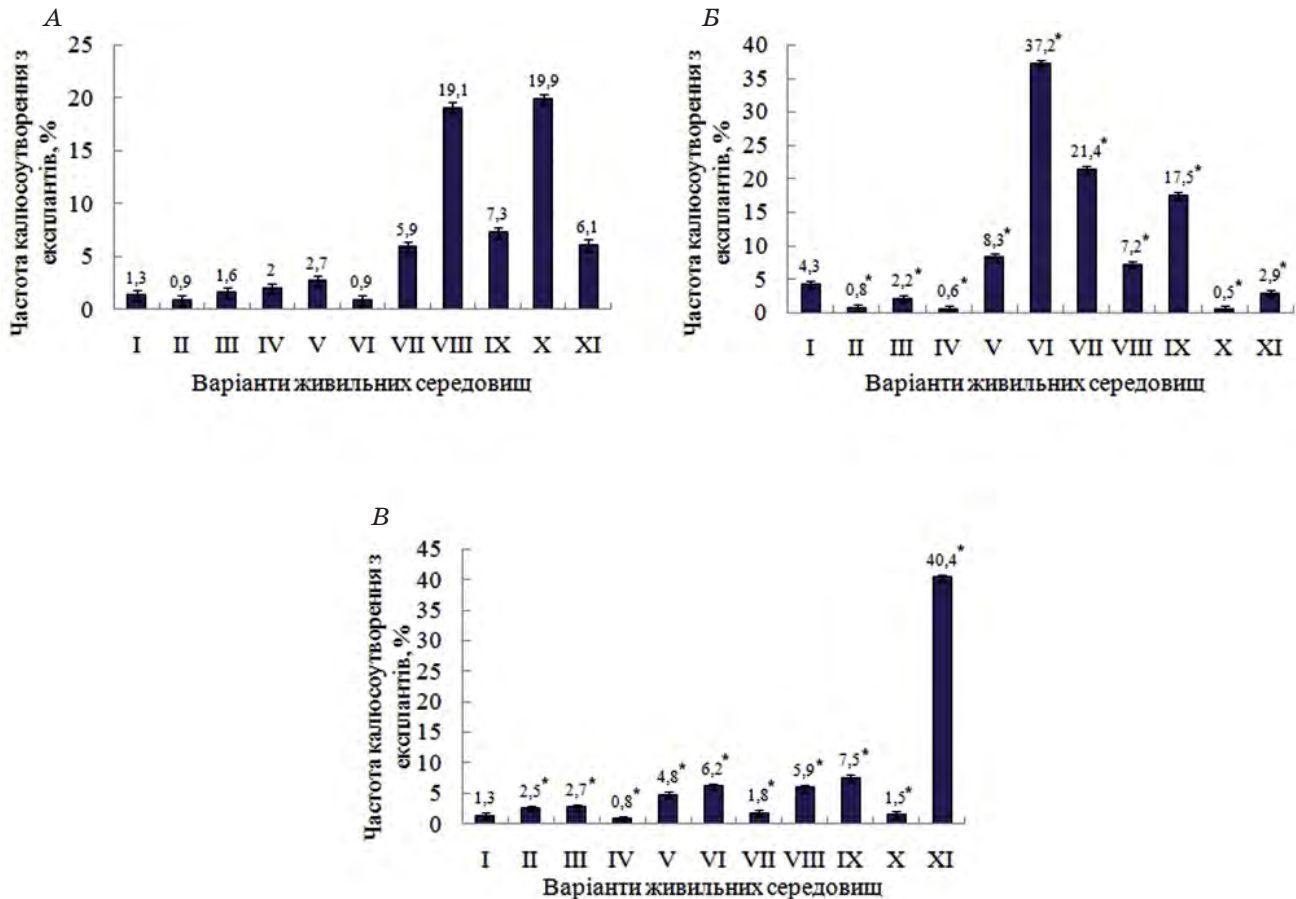


Рис. 3. Калюсогенез експлантів зав'язей (А), насінневих зачатків (Б), пиляків (В) *Ophrys sphegodes* на живильних середовищах з різними кількісними співвідношеннями екзогенних цитокініну (6-БАП) і ауксинів (ІМК, 2,4-Д)

Вміст регуляторів росту в живильних середовищах:

I — контроль (живильне середовище без регуляторів росту);

II — 0,5 мг/л 6-БАП;

III — 1,5 мг/л 6-БАП, 1,5 мг/л 2,4-Д, 1,5 мг/л ІМК;

IV — 2,0 мг/л 6-БАП, 1,5 мг/л 2,4-Д;

V — 2,0 мг/л 6-БАП, 2,0 мг/л ІМК;

VI — 2,0 мг/л 6-БАП, 2,5 мг/л 2,4-Д;

VII — 2,0 мг/л 6-БАП, 3,0 мг/л 2,4-Д;

VIII — 2,5 мг/л 6-БАП, 1,5 мг/л 2,4-Д;

IX — 2,5 мг/л 6-БАП, 3,0 мг/л ІМК;

X — 3,0 мг/л 6-БАП, 2,0 мг/л ІМК;

XI — 3,0 мг/л 6-БАП, 2,5 мг/л ІМК;

* — $P < 0,05$

У результаті проведених досліджень було одержано калюсну культуру із зав'язей, насінневих зачатків та пиляків *O. sphegodes* (рис. 4).

З'ясовано, що аналіз морфогенетичних потенцій клітин експлантів сприяє вирішенню проблеми відновлення і розмноження квіткових рослин та створенню високо-ефективних біотехнологій масового вирощування рідкісних і ендемічних видів [14]. Із експлантів насінневих зачатків та пиляків

O. sphegodes нами було отримано калюси переважно морфогенного типу — компактні, вузлуваті, щільні. Натомість калюси з експлантів зав'язей були переважно неморфогенного типу — м'які, пухкі, водянисті, зазнавали некрозу, тому в подальших дослідженнях їх не використовували. Цитологічний аналіз калюсних культур насінневих зачатків і пиляків виявив специфічні риси, зокрема значну структурну гетерогенність, наявність різних за морфологією типів утворень.



Рис. 4. Калюси з експлантів пиляків (А), насінневих зачатків (Б) і зав'язей (Б) *Ophrys taurica*

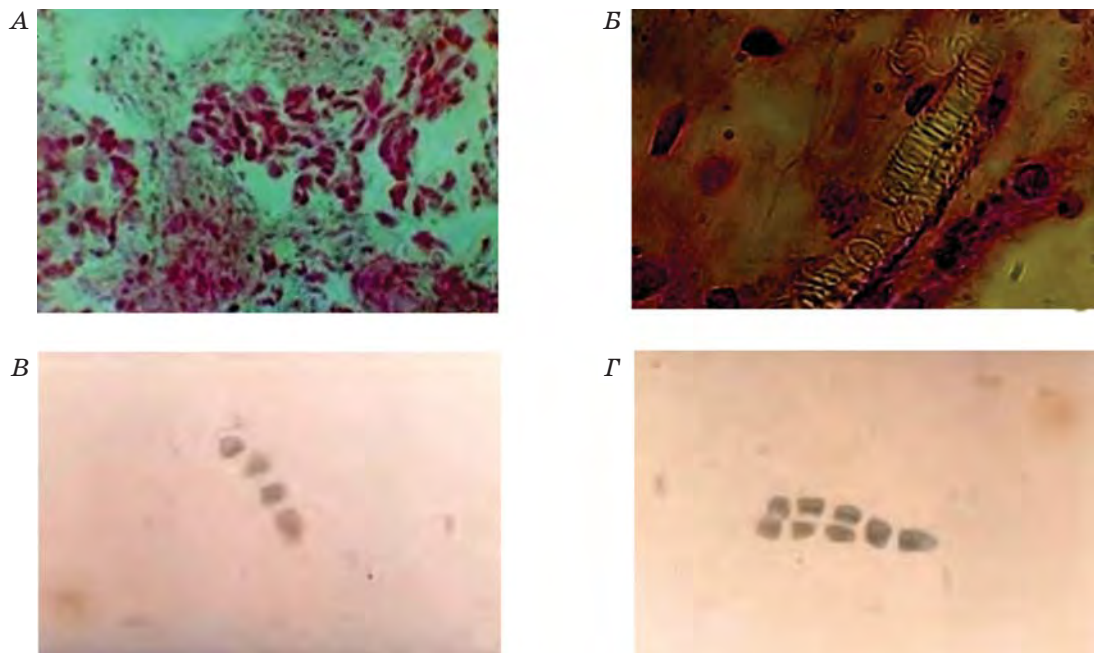


Рис. 5. Меристематичні осередки (А), початок гістогенезу (Б), чотиріклітинний (Б) і багатоклітинний (Г) ембріоїди в калюсній культурі *Ophrys sphegodes*

Прослідковувався певний зв'язок між морфологічними ознаками окремих утворень та їхніми морфогенетичними потенціями.

У калюсах насінневих зачатків та пиляків виявлено дрібні клітини з великими ядрами, які локалізувалися групами, утворюючи меристематичні осередки, поява яких свідчить про початок процесів вторинної диференціації в калюсних тканинах [14, 15]. Поділ клітин меристематичних осередків призводив до утворення лігніфікованих елементів судин та трахеїд (рис. 5).

Відомо, що одним із шляхів морфогенезу в меристематичних осередках є спонтанний ембріогенез [15–17]. Нами було встановлено, що калюсна клітина покривалася щільною оболонкою і відокремлювалася від прилеглих клітин, збільшувалася у розмірі та змінювала забарвлення. У такій клітині відбувався симетричний поділ. Унаслідок закладання

клітинних перегородок утворювалися ембріоїди (рис. 5).

Отже, у результаті проведених досліджень одержано калюсні культури *in vitro* пиляків, зав'язей і насінневих зачатків *O. sphegodes*. Цитоморфологічним аналізом встановлено значний морфогенетичний потенціал калюсних культур насінневих зачатків та пиляків, про що свідчила поява меристематичних осередків та соматичних ембріоїдів. Цитологічні дослідження процесу утворення мікроструктур із підрахунком кількості хромосом або за фактом утворення стерильного (у галоїдів) чи фертильного (у диплоїдів) пилку, габітусом рослин, наявністю насіння тощо [18–19] сприятимуть у подальшому визначенню природи походження отриманих нами новоутворень. Вивчено вплив екзогенних фітогормонів на частоту

калюсогенезу експлантів із генеративних органів і визначено оптимальні співвідношення цитокінінів та ауксинів для культивування тканин *O. sphegodes in vitro*. Розроблено біотехнологічні підходи мікроклонального роз-

множення зникаючої орхідеї флори України *Ophrys sphegodes* subsp. *tammosa* (Desf.) Soó ex E. Nelson, що відкриває шляхи для одержання рослин-регенерантів.

REFERENCES

1. Cherevchenko T. M., Lavrentieva A. N., Ivannikov R. V. Biotechnology of tropical and subtropical plants *in vitro*. Kyiv: Nauk. Dumka. 2008, 560 p. (In Ukrainian).
2. Moyo M. Plant biotechnology in South Africa: Micropropagation research endeavours, prospects and challenges. *South African Journal of Botany*. 2011, V. 77, P. 996–1000.
3. Diduh Ya. P. Red Book of Ukraine. Flora. Kyiv: Globalkonsalting. 2009, 900 p. (In Ukrainian).
4. Popovich S. Yu. List of rare biodiversity of reserves and national parks of Ukraine. Fitogenetic fund mikogenetic fund, phytocoenotic fund. Kyiv: Fitosociocenter. 2002, 276 p. (In Ukrainian).
5. Vahrusheva L. P., Svolinskiy M. D., Kucher E. N. The new location of *Ophrys taurica* (Agg.) Nevski in Crimea. *Crimea ecosystems, their optimization and security*. 2002, V. 12, P. 164–169. (In Russian).
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*. 1962, V. 15, P. 473–497.
7. Teng W. L., Nicholson L., Teng M. C. Micropropagation of *Spathoglottis plicata*. *Plant Cell Rep*. 1997, V. 16, P. 831–835.
8. Kruglova N. N., Seldimirova O. A., Zaycev D. Y., Katasonova A. A. Biotechnological evaluation of explants to obtain regenerated plants of spring wheat in an *in vitro* culture in order to adaptive selection in the conditions of the Southern Urals. *Izv. Chelyab. NC UrO RAN*. 2006, 2 (32), 94–98. (In Russian).
9. Teixeira da Silva J. A. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues. Global Science Books. London: UK. 2006, 2506 p.
10. Huan L. V. T., Tanaka M. Callus induction from protocorm-like body segments and plant regeneration in *Cymbidium* (Orchidaceae). *J. Hortic. Sci. Biotechnol*. 2004, V. 79, P. 406–410.
11. Teixeira da Silva J. A., Singh N., Tanaka M. Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus induction in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae), and assessment of cytogenetics stability in regenerated plantlets. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 2006, 84 (2), 119–128.
12. Teixeira da Silva J. A., Yam T., Fukai S., Nayak N., Tanaka M. Establishment of optimum nutrient media for *in vitro* propagation of *Cymbidium* Sw. (Orchidaceae) using protocorm-like body segments. *Prop. Ornamental Plants*. 2005, 5 (3), 129–136.
13. Morini S., D'Onofrio C., Bellocchi G., Fisichella M. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* quince leaves. *Plant Cell Organ Culture Tissue*. 2000, V. 63, P. 47–55.
14. Tiago S. B., Claudete S. C., Vanildo S., Masuo J. K., Eny I. S. *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). *Acta Botanica Brasilica*. 2009, 23 (2), 274–281.
15. Chen J., Chang W. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). *Plant Sci*. 2000, 160 (1), 87–93.
16. Huan L. V. T., Takamura T., Tanaka M. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Sci*. 2004, V. 166, P. 1443–1449.
17. Yusuf A., Thyagi R. K., Malik S. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf segments of *Piper colubrinum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2001, V. 65, P. 255–258.
18. Gorbunova V. Yu. Androgenesis *in vitro* in spring wheat. M. S. thesis, Dept. Ecology. *Rus. Saint Petersburg*. 2000. (In Russian).
19. Barnabás B. *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. *Euphytica*. 2001, V. 119, P. 211–216.

**БИОТЕХНОЛОГИЯ СОХРАНЕНИЯ
ДИКОРАСТУЩЕЙ ОРХИДЕИ
ФЛОРЫ УКРАИНЫ**
Ophrys sphegodes subsp. *mammosa*
(Desf.) Soó ex E. Nelson

Е. А. Шейко
И. В. Косаковская

Институт ботаники имени Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев

E-mail: lenasheyko@mail.ru

Целью работы было определение оптимальных условий каллусообразования в культуре *in vitro* из семязачатков, завязей и пыльников дикорастущей исчезающей орхидеи *Ophrys sphegodes* subsp. *mammosa* (Desf.) Soó ex E. Nelson с последующим использованием полученных каллусных тканей для разработки технологии клонального микро-размножения и сохранения *ex situ*. В исследованиях использовали биотехнологические (культивирование эксплантов в условиях *in vitro*) и микроскопические (изготовление временных препаратов, световая микроскопия, цитоморфологический анализ каллусных тканей) методы. Подобраны питательные среды с оптимальными концентрациями регуляторов роста и получены каллусы из генеративных органов (для завязей — среда Мурасиге–Скуга с добавлением 2,5 мг/л 6-БАП и 1,5 мг/л 2,4-Д; семязачатков — среда Нича и Нич с 2,0 мг/л 6-БАП и 2,5 мг/л 2,4-Д; для эксплантов из пыльников — среда Нича и Нич с 3 мг/л 6-БАП и 2,5 мг/л ИМК). Цитоморфологический анализ выявил в каллусах меристематические очаги, появление которых свидетельствует о начале процессов вторичной дифференциации в каллусных тканях. Полученные результаты будут использоваться в дальнейших исследованиях для получения из каллусов растений-регенерантов *O. sphegodes*.

Ключевые слова: *Ophrys sphegodes*, культура *in vitro*, каллюсогенез, фитогормоны.

**BIOTECHNOLOGY OF PRESERVATION
OF THE RARE WILD ORCHID
OF UKRAINIAN FLORA**
Ophrys sphegodes subsp. *mammosa*
(Desf.) Soó ex E. Nelson

E. A. Sheiko
I. V. Kosakivska

Institute of Botany of the National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: lenasheyko@mail.ru

The aim of the work was to determine the optimal conditions for callusogenesis in (*in vitro*) cultures of ovules, ovaries and anthers from vanishing wild orchid *Ophrys sphegodes* subsp. *mammosa* (Desf.) Soó ex E. Nelson followed by using of the obtained callus tissue to develop micropropagation techniques and conservation *ex situ*. In this study we used biotechnological (cultivation of explants *in vitro*) and microscopic (making temporary preparations, light microscopy, cytomorphological callus tissue analysis) methods. Nutrient media with optimal concentrations of growth regulators were selected and calluses derived from the generative organs were obtained (we used for ovaries Murashige–Skoog medium that contains 2.5 mg/l 6 of BAP and 1.5 mg/l of 2,4-D; for ovules — nutrient medium Nitsch and Nitsch containing 2.0 mg/l of 6-benzyladenine and 2.5 mg/l of 2,4-D, for the explants from anther — nutrient medium Nitsch and Nitsch containing 3 mg/l 6 of 6-benzyladenine and 2.5 mg/l of IBA). Cytomorphological analysis reveals the presence of meristematic foci in calluses. It indicates the beginning of the secondary processes of differentiation in the callus tissue. The results may be used in further investigations to obtain *O. sphegodes* regenerated plants from callus.

Key words: *Ophrys sphegodes*, *in vitro* culture, callus, phytohormones.