

БІОТЕХНОЛОГІЯ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ ЛАВАНДИ (*LAVANDULA ANGUSTIFOLIA MILL.*)

Т.М. МАНУШКІНА, кандидат сільськогосподарських наук
Миколаївський державний аграрний університет, Миколаїв
Л.О. БУГАЄНКО, доктор біологічних наук
Кримський інженерно-педагогічний університет, Сімферополь

Вступ

Лаванда вузьколиста (*Lavandula angustifolia* Mill.) є однією з основних ефіроолійних рослин, що культивуються в світі. Ефірна олія та суцвіття лаванди широко використовуються в парфумерно-косметичній, фармацевтичній і харчовій промисловостях. Вирощування лаванди та одержання ефірної олії в нашій країні зосереджене в Криму. В умовах ринкового виробництва планується до 2015 р. збільшити площі, зайняті під лавандою, до 10 тис. га, оскільки вирощування цієї культури є рентабельним. Однак розширення насаджень лаванди стримується відсутністю садивного матеріалу. Шляхом вирішення цієї проблеми може бути розробка більш інтенсивних біотехнологічних методів розмноження замість традиційного живцювання.

У літературі виявлена досить обмежена кількість робіт, пов'язаних з біотехнологічними дослідженнями роду *Lavandula* L. Аналіз публікацій показує, що більша частина літературних даних присвячена вивченню процесів калусо- і морфогенезу [4, 8], а також накопичення вторинних метаболітів у клітинних культурах лаванди: монотерпеноїдів [5], розмаринової кислоти [7].

Перші дослідження культури апікальних меристем лаванди розпочаті в Інституті ефіроолійних і лікарських рослин Н.І. Мещеряковою і Г.А. Сарнецьким у 1985 році [3]. У подальшому проведені нечисленні дослідження з клонального мікророзмноження, присвячені в основному вивченню гормональної регуляції розвитку апікальних меристем, що показують високу видову і сортову специфічність процесів регенерації рослин лаванди в умовах *in vitro* [1].

Виходячи з цього, метою наших досліджень було вивчення впливу внутрішніх і зовнішніх чинників на процеси морфогенезу в культурі ізольованих меристем лаванди і розроблення ефективних прийомів клонального мікророзмноження нових сортів і перспективних зразків цієї цінної ефіроолійної рослини.

Об'єкти та методи дослідження

Дослідження виконано в лабораторії біотехнології Інституту ефіроолійних і лікарських рослин УААН. Об'єктом дослідження служили рослини *L. angustifolia* сортів Степова і Сінева та перспективних селекційних зразків 337-9 і 310-17.

Донорні рослини вирощували в умовах закритого ґрунту. Як експланти використовували апікальні меристеми розміром 0,2-1,0 мм, які виділяли з верхівкових та пазушних бруньок стебла однорічних рослин. При проведенні експериментальної роботи застосовували загальноприйняті в культурі ізольованих тканин рослин методи [2].

Для культивування ізольованих меристем та мікроживців використовували базове живильне середовище Мурасіге і Скуга (МС) [6]. На кожному з етапів клонального мікророзмноження модифікували гормональний склад живильних середовищ відповідно до необхідного шляху морфогенезу, доповнюючи їх кінетином, 6-бензиламінопурином (БАП), гібереловою кислотою (ГК), а-нафтилоцтовою кислотою (НОК), індолілоцтовою кислотою (ІО_цК), індолілолійною кислотою (ІО_лК), препаратами «Емістим С» (ВАТ «Високий врожай», Україна) і «Етамон» (Всеросійській науково-дослідний інститут хімічних засобів захисту рослин, Росія).

Експланти культивували в культуральній кімнаті при температурі 25-26°C, освітленості 2-3 клк, відносній вологості повітря 60-70%.

Результати та обговорення

У процесі вивчення особливостей морфогенезу ізольованих апікальних меристем

лаванди в культурі *in vitro* визначали вплив ендо- та екзогенних факторів і добирали оптимальні умови для розвитку експлантів на чотирьох етапах клонального мікророзмноження: ізолювання експланту, введення і ініціація його розвитку в умовах *in vitro*; власне мікророзмноження; укорінення мікропагонів; адаптація мікророслин до умов *in vivo*.

Ізолювання експланту, введення і ініціація його розвитку в умовах in vitro. Стерилізацію експлантів проводили послідовним витримуванням фрагментів пагонів у 70 % -ному етанолі впродовж 40 секунд, 50 %-ному розчині препарату «Брадофен» (АТ "Флорін", Угорщина) – 12 хвилин, і тричі промивали в стерильній дистильованій воді. Дослідження показали, що такий спосіб стерилізації забезпечував вихід стерильних меристем на рівні 100%, приживлюваність меристем складала 96-100%. Добір оптимальної концентрації регуляторів росту проводили на основі живильного середовища МС, що містило 0,7% агару. В результаті досліджень встановлено, що ізолювані меристеми лаванди характеризуються високою регенераційною здатністю (частота регенерації пагонів складала 85-100% на всіх варіантах живильного середовища). Оптимальним виявилось живильне середовище, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л) – МС5, на якому частота регенерації складала 100%, розвивався основний пагін висотою 19,33 -42,98 мм з 5-8 парами листків і 3,03-7,81 додаткових пагонів.

Слід зазначити, що у лаванди на першому етапі клонального мікророзмноження множинне пагоноутворення відбувалося за рахунок формування адвентивних пагонів, тоді як кількість бічних пагонів, що розвивалися з пазушних бруньок, складала лише 9,1-17,7% від загальної кількості додаткових пагонів на один експлант. Поряд із загальними особливостями морфогенезу меристем лаванди в культурі *in vitro* виявлено значні відмінності між досліджуваними генотипами за кількісними показниками основних біометричних параметрів мікророслин. Виявлені відмінності в рості основного та додаткових пагонів на першому етапі клонального мікророзмноження зумовлювали різні коефіцієнти розмноження: у сорту Сінева – 1:12,42; у сорту Степова – 1:10,06; у зразка 337-9 – 1:8,55; у зразка 310-17 – 1:7,18.

Проведене дослідження не виявило суттєвої різниці в регенераційній здатності апікальних меристем лаванди, виділених з верхівкових і пазушних бруньок пагону. У всіх генотипів лаванди при культивуванні меристем спостерігалася висока частота регенерації (90-100%), і частота формування множинних пагонів (68,8-100%).

Апікальні меристеми лаванди вводили в культуру *in vitro* в чотири строки, які відповідали окремим фенофазам: у квітні – у фазу весняного відростання; в третій декаді червня - першій декаді липня – у фазу бутонізації-початку цвітіння; в жовтні – у фазу осіннього відростання; в січні – у період спокою. У всі строки введення в культуру *in vitro* меристеми виявилися здатними регенерувати рослини з високою частотою (90-100%) і утворювати адвентивні пагони з частотою 85-100%. Поряд з цим встановлено, що оптимальним строком для введення меристем є фази весняного і осіннього відростання пагонів (квітень і жовтень), коли регенерували рослини з нормальними морфологічними ознаками, формувалися найвищі основні пагони і найбільша кількість додаткових пагонів.

Власне мікророзмноження. На даному етапі як експланти використовували мікроживці, які одержували при розділенні основного пагона меристемних рослин на фрагменти довжиною 4-8 мм з однією парою листків та відокремленні додаткових пагонів довжиною 4-8 мм з однією парою розгорнутих листків. Найбільш оптимальний розвиток мікропагонів відбувався на живильному середовищі МС5. Для одержання максимальної кількості мериклонів при подальшому субкультивуванні поєднували мікроживцювання основних пагонів та відокремлення додаткових пагонів. Генотипічні особливості сортів та зразків обумовлювали різну інтенсивність ростових процесів і, як наслідок, різні коефіцієнти розмноження: у сорту Сінева – 1:11,12; у сорту Степова – 1:10,42; у зразка 337-9 – 1:11,83; у зразка 310-17 – 1:6,72.

Вивчення особливостей розвитку меристемних рослин лаванди протягом десяти пасажів показало, що вони характеризуються високою регенераційною здатністю протягом усього терміну культивування *in vitro*. Частота регенерації у сортів Сінева, Степова і зразка 337-9 залишалася стабільно високою до 10-го пасажу і складала 80,0-100,0%. Найнижчою регенераційною здатністю відрізнявся зразок 310-17, у якого, починаючи з 5-го пасажу, частота регенерації пагонів знижувалася до 72,5-47,5%. При цьому у досліджуваних генотипів не спостерігалася різких коливань коефіцієнту розмноження в різних пасажах, і цей показник зберігався на стабільному рівні у сорту Сінева і зразка 337-9 до 8-го пасажу (1:7,77-12,45 і

1:7,60-11,85 відповідно), у сорту Степова – до 7-го пасажу (1:6,19-11,81), у зразка 310-17 – до 6-го пасажу (1:6,14-8,37). Таким чином, при клональному мікророзмноженні лаванди доцільно проводити 6–8 пасажів залежно від генотипу.

Укорінення мікропагонів в умовах *in vitro*. Найбільш ефективним для індукції коренеутворення у мікропагонів лаванди виявилось живильне середовище 'ЛМС, доповнене Ю_нК та Ю_цК в концентрації по 0,5 мг/л - МС18, на якому частота укорінення становила 100% у сортів Сінева, Степова і у зразка 337-9, та 85% у зразка 310-17. В наших дослідженнях випробовували також ефективність рістрегулюючих препаратів «Емістим С» та «Етамон» для стимулювання коренеутворення у мікропагонів лаванди в умовах *in vitro*. Показано, що при включенні до складу живильних середовищ «Емістим С» в розведенні 10⁻⁶ та «Етамон» в концентрації 0,001% частота укорінення мікропагонів складала 90-100%.

Адаптація мікророслин до умов *in vivo*. Для адаптації відбирали мікророслини лаванди з добре розвинутою кореневою системою і висаджували в горшечки об'ємом 200 мл зі стерильним субстратом різного складу. Горшечки з рослинами розміщували під плівковим укриттям і культивували при температурі 18-20°C і постійному зволоженні. Найвища приживлюваність мікророслин всіх генотипів - 95-100% була забезпечена на субстраті торф: перліт: ґрунт: пісок у співвідношенні 2:1:1:1. Визначено, що для адаптації меристемних рослин лаванди до умов *in vivo* достатньо періоду 14 діб, за які формується 2-3 пари листків. Після періоду адаптації плівкове укриття знімали і рослини культивували в звичайних умовах ще 46 діб. Меристемні рослини лаванди мали типові для сортів та зразків морфологічні ознаки: форму куща, листків, суцвіття, забарвлення квіток. У жодному випадку у мериклонів не було відмічено морфологічних відхилень від норми.

У результаті досліджень вивчено особливості морфогенезу ізолюваних меристем лаванди (рис.) та розроблено всі етапи технології клонального мікророзмноження цієї культури. За розробленою біотехнологією в середньому за рік можна провести шість пасажів. За розрахунками, проведеними на основі експериментальних даних, кількість мікроживців з однієї ізолюваної меристеми за цей період може складати: у сорту Сінева – 23,1 млн. шт., у сорту Степова – 6,0 млн. шт., у зразка 337-9 – 9,3 млн. шт., у зразка 310-17 – 1,1 млн. шт. При одержанні саджанців за рік можна провести етап введення, чотири пасажі на етапі власне мікророзмноження, етапи укорінення мікропагонів і адаптації до умов *in vivo*. Сумарний вихід саджанців з однієї меристеми за рік складає: у сорту Сінева – 208 тис. шт., у сорту Степова – 119 тис. шт., у зразку 337-9 – 149 тис. шт., у зразку 310-17 – 23 тис. шт.

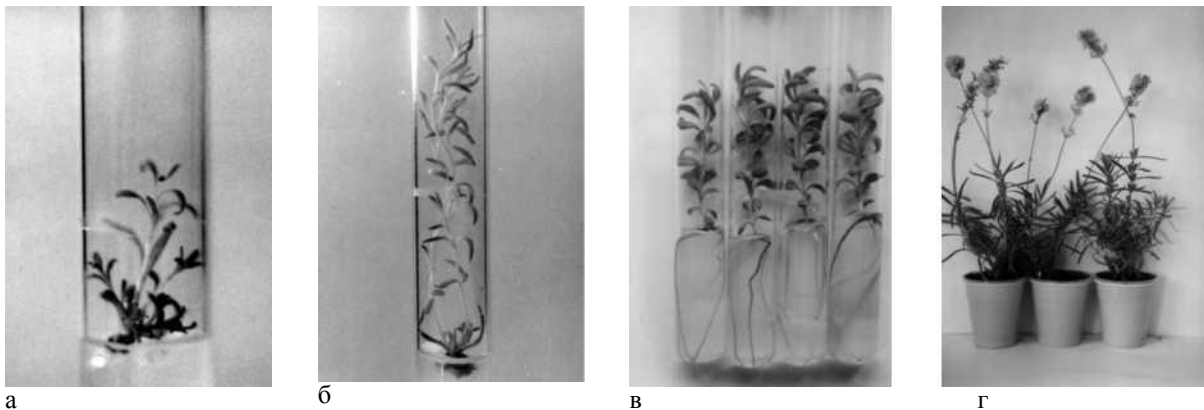


Рис. Морфогенез ізолюваних меристем лаванди на чотирьох етапах клонального мікророзмноження: а – ізолювання експланта, введення і ініціація його розвитку в умовах *in vitro*; б – власне мікророзмноження; в – укорінення мікропагонів; г – адаптація мікророслин до умов *in vivo*

Висновки

1. Вивчено особливості морфогенезу в культурі ізолюваних апікальних меристем *L. angustifolia* сортів Сінева, Степова та перспективних селекційних зразків 337-9 і 310-17.

2. На основі результатів досліджень розроблено біотехнологію клонального мікророзмноження лаванди.

Список літератури

1. Егорова Н.А. Микроразмножение лаванды *in vitro* // Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер. Біологія. – 2002. – № 9 (1). – С. 65-71.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии культурных растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
3. Разработка технологии и средств механизации для выращивания посадочного материала лаванды, обеспечивающих выход черенков не менее 2 млн. с 1 га и 250 саженцев с 1 кв. м: Отчет о НИР / Институт эфиромасличных и лекарственных растений. № ГР 01850071679. – Симферополь, 1990. – 126 с.
4. Calvo M.C., Segura J. *In vitro* morphogenesis from explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* seedlings // Scientia Hort. – 1988. – N 36. – P. 131-137.
5. Lappin G.J., Stride J.D., Tampion J. Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia* // Phytochemistry. – 1987. – V. 26, N 4. – P. 995-997.
6. Murashige T., Skoog F.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. plant. – 1962. – V. 15, N 13. – P. 473-497.
7. Pavlov A.I., Piieva M.P., Panchev I.N. Nutrient medium optimization for rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension // Biotechnol. Progr. – 2000. – V. 16, N 4. – P. 668670.
8. Quazi M.H. *In vitro* multiplication of *Lavandula* spp. // Ann Bot. – 1980. – V. 45, N 3. – P. 361362.

Рекомендовано к печати д.б.н, проф. Митрофановой О.В.