

ОСОБЛИВОСТІ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* РІДКІСНИХ ТАКСОНІВ ГВОЗДИК УГОРЩИНИ

Золтан ЧЕГ¹, Юдіт ДОБРАНСЬКІ¹, Іветт НОВАК-ГЕРМАН¹, Пал СОРВОШ¹, Дора ФОРКОШ¹, Юдіт ЧОБОЙ², Анжела КОЛЕСНИК³

Культивування рослин *in vitro* на сьогодні є одним із поширених методів вегетативного розмноження рослин. Це дає змогу в короткі строки на невеликих площах і відносно недорого отримувати у великих кількостях однорідний посадковий матеріал, зберігати особливо цінні фено- й генотипи чи отримувати біологічно активні речовини рослинного походження. Використання методу мікроклонального розмноження рослин є чудовим доповненням для збереження критичних видів, які перебувають під загрозою зникнення в природних локалітетах або ж мають ускладнене генеративне відтворення. Головною метою наших досліджень було з'ясувати особливості введення в культуру тканин трьох рідкісних і зникаючих видів флори Угорщини, а саме *Dianthus plumarius ssp. praecox* (Willd. ex Spreng.) Domin, *Dianthus giganteiformis* Borbás ssp. *pontederai* (Borbás) Soó та *Dianthus superbus* L. Як вихідні експланти використовували здорове й життєздатне насіння. Стерилізаційними реагентами були різні концентрації хлориду ртуті (HgCl₂), гіпохлориду натрію (NaClO) та господарського хлораміну В (NH₂Cl). Надалі рослини вирощували на агаризованому безгормональному середовищі Мурасіге і Скуга. Встановлено, що для насіння трьох досліджених таксонів гвоздик найбільш оптимальною є стерилізація 2,5%-м хлораміном В протягом 15 хв, це забезпечує отримання асептичного посадкового матеріалу, здатного інтенсивно проростати й утворювати життєздатні експланти. Для індукції ризогенезу найбільш оптимальним є модифіковане середовище МС з додаванням індолілоцтової кислоти в концентрації 0,1 мг/л, вирощені за таких умов рослини легко і з високою імовірністю акліматизовуються до асептичних умов зростання.

Ключові слова: *Dianthus*, *in vitro*, мікроклональне розмноження, стерилізація, постасептична адаптація.

¹Факультет сільського господарства, харчових технологій і природокористування, Дебреценський університет, вул. Вілмоша Вестсіка 4–6, Ніредьгаза, 4400, Угорщина; e-mail: cseh.zoltanne@agr.unideb.hu, dobranszkyjudit@agr.unideb.hu, novakhermann.ivett@agr.unideb.hu, szarvas.pal@agr.unideb.hu, farkas.dora@agr.unideb.hu

²Інститут технології та сільськогосподарських наук Ніредьгазького університету, вул. Комаї, 9–11, Ніредьгаза, 4400, Угорщина; e-mail: csabai.judit@nye.hu

³Біологічний факультет, Ужгородський національний університет, вул. Волошина, 32, Ужгород, 88000, Україна; e-mail: angela.kolesnyk@uzhnu.edu.ua

The peculiarities of *in vitro* introduction of rare carnation taxa from Hungary. Cseh Z.¹, Dobránszky J.¹, Novák-Hermann I.¹, Szarvas P.¹, Farkas D.¹, Csabai J.², Kolesnyk A.³

Cultivation of plants *in vitro* is currently one of the most common methods of vegetative propagation of plants. It makes it possible to obtain homogeneous planting material in large quantities within a short time, on small areas, and at relatively low cost; to preserve particularly valuable pheno- and genotypes, or to obtain biologically active substances of plant origin. The use of microclonal plant propagation is an excellent complement to the conservation of critical species that are endangered in their natural habitats or have difficult generative reproduction. The main goal of our research clarification the peculiarities of tissue culture of three rare and endangered species of the Hungarian flora, viz. *Dianthus plumarius ssp. praecox* (Willd. ex Spreng.) Domin, *Dianthus giganteiformis* Borbás ssp. *pontederai* (Borbás) Soó, and *Dianthus superbus* L. Healthy and viable seeds were used as initial explants. The sterilising reagents used were different concentrations of mercuric hippochloride (HgCl₂), sodium chloride (NaClO) and commercial chloramine B (NH₂Cl). Subsequently, the plants were grown on Murashige and Skoog agarified hormone-free medium. It was established that for the seeds of the three researched carnation taxa, sterilization with 2,5% chloramine B for 15 minutes is the most optimal, this ensures obtaining aseptic planting material capable of intensive germination and formation of viable explants. For the induction of rhizogenesis, the most optimal is a modified MS medium with the addition of indolylacetic acid at a concentration of 0,1 mg/l.

Plants grown under such conditions are easily and with a high probability acclimatized to aseptic growth conditions.

Key words: *Dianthus*, *in vitro*, microclonal propagation, sterilisation, post-aseptic adaptation.

¹Faculty of Agriculture, Food Science and Environmental Management, Centre for Agricultural Genomics and Biotechnology, University of Debrecen, 4–6, Westsil Wilmos str., Nyiredyhaza, 4400, Hungary; e-mail: cseh.zoltanne@agr.unideb.hu, dobranszkyjudit@agr.unideb.hu, novakhermann.ivett@agr.unideb.hu, szarvas.pal@agr.unideb.hu, farkas.dora@agr.unideb.hu

²Engineering and Agricultural Institute, Nyiredyháza University, 9–11, Kótaji str., Nyiredyháza, 4400, Hungary; e-mail: csabai.judit@nye.hu

³Faculty of Biology, Uzhgorod National University, 32, A.Voloshina str., Uzhhorod, 88000, Ukraine; e-mail: angela.kolesnyk@uzhnu.edu.ua

Вступ

На сьогодні людство нарешті зрозуміло, що втрата з нашого довкілля навіть однієї, на перший погляд, незначної складової може нанести непоправну шкоду для екосистеми загалом. У наукових ботанічних і природоохоронних установах багатьох країн ведуться дослідження, спрямовані на вдосконалення наявних і пошук нових способів збереження та відтворення рідкісних видів (Rands 2010). Збереження таких таксонів – надзвичайно актуальне завдання сьогодення, враховуючи швидкість та інтенсивність руйнування природних місцезростань, спричинену насамперед значним антропогенним навантаженням на довкілля, у тому числі забруднення ксенобіотиками, фізичним знищенням локалітетів тощо, а також тенденціями глобальних змін клімату. В останні десятиріччя культивування в стерильних умовах *in vitro* стало істотним доповненням до традиційних методів розмноження рослин. Таким чином ми можемо зберігати особливо цінні фенотипи, а також отримувати у великих кількостях і на невеликих площах однорідний посадковий матеріал. Використання методу мікроклонального розмноження рослин є чудовим доповненням для збереження критичних видів, які перебувають під загрозою зникнення в природних локалітетах або ж мають ускладнене генеративне відтворення (Reed et al. 2011; Debnarh et al. 2006; Dudits, Heszky 2003; Razdan 2003).

Зменшення біорізноманіття наших екосистем стало наразі не тільки актуальною проблемою сьогодення, а й своєрідним викликом для науковців. Фахівцями відділення екології Академії наук Угорщини було проведено аналіз негативних тенденцій в довкіллі, що мають місце в сучасному світі, та проаналізовані шляхи їх подолання (Hideg et al. 2019). Традиційні методи збереження природного генофонду виявляються часто або складні у виконанні, або ж і зовсім не доступні, саме тому технології *in vitro* можуть бути з великим успіхом використані із цією метою (Engelmann 1997; Touchell 1999; Sarasan 2006).

Класичні способи вирощування рослин *ex situ* вимагають значних земельних площ, відповідних фахівців і постійного догляду за рослинами. Успіх такого культивування часто залежить від тривалості вегетаційного періоду останніх та агрокліматичних умов (Crisan, Petrus 2016; Bergmann 1998).

Культивування *in vitro* базується на вирощуванні рослин у стерильних умовах на штучних поживних середовищах (Paunescu 2009). Успіх подібного культивування насамперед залежатиме від якості первинного експланта (частини рослини-донора, яка вводиться в культуру). Головними критеріями рослин-культivarів є їх габітус, відсутність вад і захворювань (Jámborné Benczúr, Dobránszki 2005; Fay 1992). На початкових етапах введення в культуру тканин, залежно від типу первинного експланта, використовують різні антисептики. Стерилізація живих тканин відбувається в більш «м'яких» умовах, ніж насіння, і вважається успішною, якщо експлант залишається життєздатним і асептичним. Проростки, вирощені з асептичного насіння, також стерильні (Paunescu 2009).

Введення в культуру тканин рідкісних і зникаючих видів рослин, їх розмноження в умовах *in vitro* та наступна ревіталізація є перспективним методом збереження фітогенофонду й відновлення природних екосистем (Chiorchina 2021).

Метою наших досліджень було з'ясувати особливості введення в культуру тканин трьох видів гвоздик (родина *Caryophyllaceae* L.), а саме *Dianthus plumarius* ssp. *praecox* (Willd. ex Spreng.) Domin, *Dianthus giganteiformis* Borbás ssp. *pontederacae* (Borbás) Soó та *Dianthus superbus* L. Ці рослини належать до рідкісних і зникаючих видів флори Угорщини, у незначній кількості зустрічаються в природних локалітетах національних парків Бюкк і карстових виходах Агтелекі. Природоохоронна вартість *D. plumarius* становить 100 000 форинтів, а двох інших відповідно 5000–5000 Ft (Bartha 2012; Farkas 1999).

Головним завданням наших досліджень був підбір оптимального режиму стерилізації для введення в культуру *in vitro* досліджуваних видів

Dianthus L. з метою збереження генофонду рідкісних і зникаючих видів флори Угорщини, для наступного тиражування в культурі тканин та використання живців як для ревіталізації зникаючих локалітетів, так і для отримання достатньої кількості посадкового матеріалу особливо атрактивних рослин без винищення їх у природних екосистемах.

Матеріал і методики

Одним із важливих ключових етапів культивування рослин *in vitro* є стерилізація посадкового матеріалу.

Дослідження проводили в лабораторіях мікроклонального розмноження рослин факультету сільського господарства, харчових технологій і природокористування Дебреценського університету й Інституту технології та сільськогосподарських наук Ніредьгазького університету (Угорська республіка). Вихідним матеріалом слугувало насіння трьох рідкісних для флори Угорщини видів гвоздик, зібране з колекційних ділянок ботанічних садів Ніредьгазького університету та Ліпчеї (Угорська республіка).

Dianthus giganteiformis Borbás *ssp. pontederiae* – рідкісний підвид в Угорщині. Багаторічна трав'яна рослина 40–50 см заввишки. Листки яскраво-зелені, лінійно-ланцетоподібні, сидячі, 3–5 мм завширшки, листкова піхва 1–1,5 мм завдовжки. Суцвіття – густа багатоквіткова китиця (кількість квіток у китиці – 10–20 шт). Чашечка із зрослими чашолистками, 13–15 мм завдовжки, зовнішні лусочки жовтувато-коричневі, загострені на верхівці, коротко-опушені, майже голі. Пелюстки темно-червоного кольору в кількості 5 шт., кожна 4–5 мм завдовжки, з довгими нігтиками і зубчастим, торочкуватим розсіченим відгином. Плід – суха одонасінна коробочка, що розкривається стулками. Цвіте в травні – червні. Поширення – затінені схилі степові луки та карстові чагарникові ліси (Bartha 2012; Farkas 1999).

Dianthus plumarius ssp. praecox – зникаючий таксон в Угорщині. Зустрічається в національних парках Бюкк і карстах Агтелекі. Північно-карпатський гірський ендемічний підвид. Багаторічна трав'яна рослина, 15–25 см заввишки. Стебла чотиригранні, з 3–5 парами навхрестсупротивних лінійних листків, які 4–6 см завдовжки, яскраво-зелених влітку і сірого кольору – восени. Квітки здебільшого поодинокі на верхівках пагонів. Чашечка червонуватого відтінку, зрослолиста, 20–25 x 4 мм, що становить близько третини розміру квітки. Квітки білі або блідо-рожеві, з торочкуватим 5-членним віночком. Цвіте в травні –

липні. Поширений на кальцефільних луках (Bartha 2012; Farkas 1999).

Dianthus superbus – рідкісний вид в Угорщині. Багаторічна трав'яна рослина 30–90 см заввишки. Верхні листки пагона лінійні, нижні – лінійно-ланцетоподібні, цілокраї. Суцвіття багатоквіткове (іноді поодинокі квіти) з приємним ароматом квіток. Чашечка зрослолиста, трубчаста, до верхівки звужується. Пелюстки білого або блідо-рожевого кольору, видовжені, майже до основи бахромчасті, 1,3–3,0 см завдовжки. Цвіте в червні – серпні. Рослини зростають на заливних луках (Bartha 2012; Farkas 1999).

Для отримання асептичних рослин використовували доброякісне, візуально здорове й непошкоджене насіння, яке ретельно промивали проточною водою з додаванням детергенту (у нашому випадку рідкого мила з антибактеріальними властивостями), після чого знову прополіскували протягом 30 с. Як стерилізаційні реагенти використовували такі розчини: 0,1%-й хлорид ртуті ($HgCl_2$) – експозиція 3 хв; 1,5 та 3%-й гіпохлорид натрію ($NaClO$) – тривалість експозиції 15, 10 та 3 хв відповідно; господарський хлорамін В (NH_2Cl) у розведеннях 2,5 та 5%, час експозиції 15, 10 та 5 хв (табл. 1). Далі насіння ополіскували стерильним дистилатом, після занурювали в 70%-й спирт і знову тричі ретельно промивали дистильованою водою, після чого залишали в ній на 10 хв. Виймали на стерильний фільтрувальний папір і висушували в стерильному боксі до повного висихання насіння.

Для проростання після стерилізації насіння висаджували на агаризоване безгормональне живильне середовище Мурасіге і Скуга (МС) (Murashige, Skoog 1962), яке містило 0,65% агар-агару, 3% сахарози та 100mg/l^1 мезоінозиту. Кислотність на рівні рН 5,8 регулювали додаванням 1N NaOH та 1N HCl. Середовище автоклавували 20 хв за температури $121\text{ }^\circ\text{C}$ та тиску 0,1 МПа. У стерильні банки наливали по 70 мл середовища та висаджували по 5 насінин у кожному (рис. 1). Колби з висадженим насінням культивували три тижні за 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення 6000–8000 люкс, довжини хвилі 460–660 нм, температури повітря $22\text{--}24\text{ }^\circ\text{C}$.

Одночасно для перевірки природної схожості частина насіння була висаджена на фільтрувальний папір у чашки Петрі, які поливали відстояною проточною водою (рис. 2), пророщували за температури $25\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 48 годин.

Результати

Результати пророщування насіння в контролі виявили високий природний рівень життєздатно-



Рис. 1. Культивування насіння в лабораторії *in vitro*
 Fig. 1. Cultivation of seeds in laboratory *in vitro*

сті діаспор. Для всіх трьох видів відсоток проростання насіння був вищий за 90%. Це дало нам підстави вважати, що ніяких додаткових стимуляторів росту на перших етапах введення в культуру *in vitro* використовувати не потрібно.

Результати дослідження ефективності стерилізації насіння за дії різних антисептиків і різної тривалості експозиції наведені в табл. 1. Під час експерименту відстежували такі показники: наявність мікробної та/або грибової контамінації в колбах із простерилізованим насінням, наявність життєздатних асептичних проростків, частка життєздатних рослин у культурі через три тижні. Ефективність стерилізації констатували після висадження насіння на поживне середовище рутинним «так / ні» (де «так» – наявність бактеріальної та/або грибової контамінації середовища, «ні» – повна відсутність такої контамінації) (Vertani 1952). Далі асептичні проростки культивували протягом трьох тижнів у культуральні, спостерігаючи за їх ростом і розвитком.

Нами встановлено, що варіанти III, IV та VI не були успішними, насіння вкривалося цвільлю та/або не проростало. Очевидно, що це було результатом недовості стерилізаційних розчинів чи невідповідного часу стерилізації. У варіанті I насіння та поверхня середовища залишалися чистими, однак жодна насінина не проросла. Це, вочевидь, є свідченням того, що стерилізаційний реагент виявився занадто сильним і пошкоджував зародок рослини. У варіантах II та V рослини проростали, залишалися стерильними, однак під час дослідження поступово слабшали й незабаром гинули. Тільки у варіанті VII ми спостерігали максимальну кількість асептичних життєздатних здорових проростків

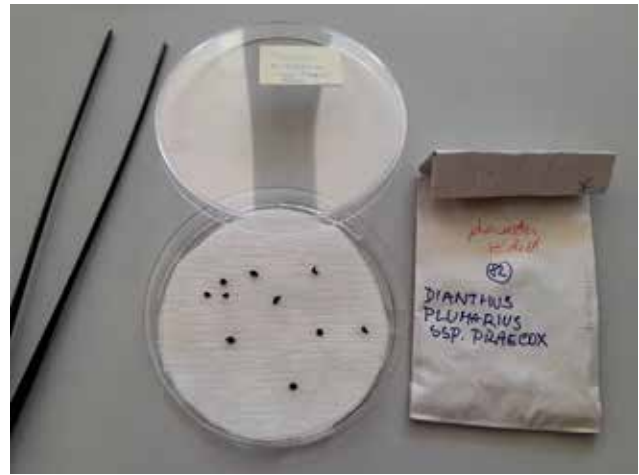


Рис. 2. Проростання насіння в чашках Петрі
 Fig. 2. Seed germination in Petri dishes

(частка виживання після стерилізації та проростання становила 100%).

Надалі експланти пасажували в пробірки на модифіковане середовище МС з додаванням 0,1 мг/л (0,49 μ М) індолицтової кислоти (ІОК) для індукції та прискорення ризогенезу. Через три тижні культивування спостерігали потужне коренеутворення у 90% досліджуваних регенерантів (рис. 3). Насьогодні колекційні культивари зберігаються в лабораторії на безгормональному середовищі МС з регулярним пасажуванням кожен 21 день (рис. 4).

Наступним етапом було переведення укорінених рослин з асептичних умов у септичні. Для цього ростки пересаджували спочатку на перліт. Найбільш критичними для рослин були перші дні після зміни середовища й повітряної експозиції,

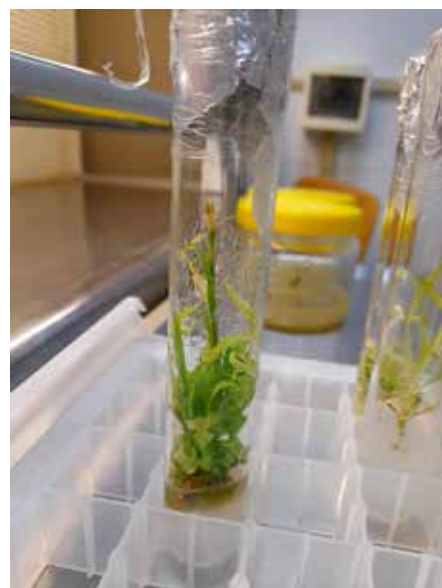


Рис. 3. Ризогенез в культурі *in vitro*
 Fig. 3. Rhizogenesis in *in vitro* culture

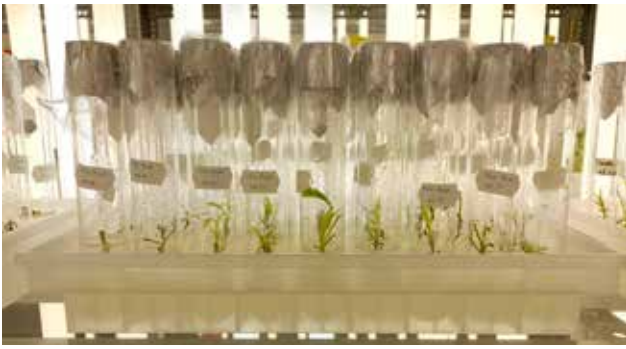


Рис. 4. Колекція культиварів в лабораторії
Fig. 4. Collection of cultivars in laboratory

частина їх гинули: висихало листя або загнивало коріння. Потім проводили пересадку у ґрунтовий субстрат в умовах оранжереї. Загалом успішна постасептична адаптація спостерігалася у 80% саджанців, що є дуже високим показником.

Висновки

Одним із ключових моментів мікроклонального розмноження рослин є стерилізація посадкового матеріалу. Вирішивши цю проблему, підбравши дієві стерилізаційні розчини та час експозиції, можна добитися швидкого й успішного введення в культуру для подальшого підтримання в колекції *in vitro* та використання в міру потреби.

За результатами нашого дослідження було встановлено основні особливості введення в культуру *in vitro* рідкісних і зникаючих у флорі Угорщини

таксонів роду *Dianthus*. Для насіння трьох досліджених таксонів гвоздик найбільш оптимальною є стерилізація 2,5%-м хлораміном В протягом 15 хв, ця методика забезпечує отримання асептичного посадкового матеріалу, здатного інтенсивно проростати й утворювати життєздатні експланти високого рівня віталітету.

На перших етапах проростання й культивування, а також для підтримання колекції в культурі *in vitro* доцільно використовувати безгормональне середовище МС. Для індукції ризогенезу найбільш оптимальним є модифіковане середовище МС з додаванням ІОК в концентрації 0,1 мг/л. Рослини, вирощені за таких умов, легко і з високою імовірністю акліматизовуються до асептичних умов зростання й можуть бути використані з метою ревіталізації в природних екосистемах або ж для культивування з декоративною метою.

Подяки

Висловлюємо щирі вдячність за отриманий посадковий матеріал і насіння ботанічним садам Клагенфурт (Австрія), Ліпчей і ботанічному саду м. Егер (Угорська Республіка). Також центру сільськогосподарської геноміки та біотехнології факультету сільського господарства, харчових технологій і природокористування Дебреценського університету, Інституту сільськогосподарських наук Ниредьгазького університету за надані можливості, лабораторії та витратні матеріали для проведення цього дослідження.

BAE, K.H., YOON, E.S. (2015) Seed germination and *in vitro* plant regeneration through callus culture of two Lichnis species. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 25 (1), 1–12.

BARTHA, D. (2012) Természeti védelmi növénytan. Mezőgazda kiadó, Budapest.

CHIORCHINA, N., GHEREG, M., TABARA, G.M., KUTKIVSKI-MUSHTUK, A. (2021) Micropropagation and maintenance of rare plants tough *in vitro* culture. *Proceedings of the XI International Congress of Geneticists and Breeders of the Republic Moldova*, June 15–16, 2021, Chisinau, Moldova, pp. 151.

CRIȘAN, L.R., PETRUȘ-VANCEA, A. (2016) *Paulownia tomentosa* L. *in vitro* propagation. *Natural Resources and Sustainable Development*, 6, 30–37.

DEBNATH, M., MALIK, C., BIEN, P. (2006) Micropropagation: A Tool for the Production of High Quality Plant-based Medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(1), 33–49. DOI:10.2174/138920106775789638

DUDITS, D., HENSZKY, L. (2003) Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó.

ENGELMANN, F. (1997) *In vitro* conservation methods. In: Callow, J.A., Ford-Lloyd, B.V., Newbury, H.J. (Eds), *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*, CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 119–161.

FARKAS, S. (1999) *Magyarország védett növényei*. Mezőgazda kiadó, Budapest.

FAY, M.F. (1992) Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 28, 1–4.

HIDEG, É. MIHÓK, B., GÁSPÁR, J., SCHMIDT, P., MÁRTON, A., FABÓK, V., BÁLDI, A. (2019) *Környezeti jövőkutatás – Magyarország 2050*. Ökológiai Kutatóközpont tanulmányai, Budapest.

JÁMBORNÉ BENCZÜR, E., DOBRÁNSZKI, J. (2005) *Kertészeti növények mikroszaporítása*. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473–497.

- POP, T.I., PAMFIL, D. (2011) *In vitro* Preservation of three Species of *Dinathus* from Romania. *Bullentin UASVM Horticulture*, 68 (1), 414–422.
- PUNESCU, A. (2009) Biotechnology for endangered plant conversion: a critical overview. *Romanian biotechnological letters*, 14(1), 4095–4103.
- RANDS MR, ADAMS WM, BENNUN L, BUTCHART SH, CLEMENTS A, COOMES D, ENTWISTLE A, HODGE I, KAPOV V, SCHARLEMANN JP, SUTHERLAND WJ, VIRA B. (2010) Biodiversity conservation: challenges beyond 2010. *Science*, 329(5997), 1298–1303.
- RAZDAN, M.K. (2003) *Introduction to Plant Tissue Culture*. Intercept.
- REED, B.M., SARASAN, V., KANE, M., BUNN, E., PENCE, V.C. (2011) Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47, 1–4.
- SARASAN, V., CRIPPS, R., RAMSAY, M.M, ATHERTON, C., McMICHEN, M., PRENDERGRAST, G., ROWNTREE, J.K. (2006) Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42, 206–214.