

УДК 633.812.754

ЛАВАНДА ЯК ОБ'ЄКТ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Бугаєнко Л.О., д.б.н., професор, Манушкіна Т.М., к.с.-г.н.*

*РВНЗ «Кримський інженерно – педагогічний університет»,
Миколаївський державний аграрний університет

Вивчено морфогенез ізольованих апікальних меристем лаванди в культурі *in vitro*. Розроблено технологію клонального мікророзмноження лаванди.

Ключові слова: лаванда, апікальна меристема, розмноження, регулятори росту, in vitro.

Бугаєнко Л.А., *Манушкіна Т.М. ЛАВАНДА КАК ОБЪЕКТ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ / РВНЗ «Крымский инженерно педагогический университет», *Николаевский государственный аграрный университет, Украина.

Изучено морфогенез изолированных апикальных меристем лаванды в культуре *in vitro*. Разработана технология клонального микропомножения лаванды.

Ключевые слова: лаванда, апикальная меристема, размножение, регуляторы роста, in vitro.

Bugaenko L.A. *Manushkina T.M. LAVENDER AS THE OBJECT OF BIOTECHNOLOGICAL RESEARCHES / Republican institution of higher education (RIHE) «Crimean engineering pedagogical university» *Nikolaevskiy state agrarian university, Ukraine

Morphogenetic potentialities of isolated apical meristems of lavender in culture *in vitro* are investigated. The technology of clonal micropropagation of lavender is developed.

Key words: lavender, apical meristem, propagation, growth regulation, in vitro

ВСТУП

Сучасна біотехнологія представляє собою сукупність технологій, які передбачають використання біологічних процесів живих клітин, макро- і мікромолекул з метою одержання заданих продуктів [1]. Одним із напрямків біотехнології є культура *in vitro* клітин, тканин та органів рослин, що використовується в науці для створення експериментальних біологічних систем та в селекційній і рослинницькій практиці [2].

Однією з пріоритетних культур в ефіроолійній галузі України є лаванда. Ефірна олія лаванди широко використовується в парфумерно-косметичній, фармацевтичній і харчовій промисловостях. Розробка біотехнологій для лаванди представляє як наукову, так і практичну цінність, пов'язану з можливістю більш швидко створювати нові сорти, одержувати оздоровлений чистосортний посадковий матеріал, прискорити впровадження нових сортів у виробництво, а також інтенсивно розмножувати унікальні генотипи для забезпечення селекційних програм.

Зараз в літературі виявлена досить обмежена кількість робіт, пов'язаних із біотехнологічними дослідженнями роду *Lavandula* L. Аналіз публікацій показує, що більша частина літературних даних присвячена вивченню процесів калусо- і морфогенезу, а також накопичення вторинних метаболітів у клітинних культурах лаванди.

Немає єдиної думки з питання соматоклональної варіативності калусних культур лаванди. Багато дослідників показують можливість мікророзмноження лаванди методом регенерації рослин із калусних культур шляхом органогенезу або соматичного ембріогенезу [3-6]. У той же час інші вчені [7, 8] вказують на значну соматоклональну мінливість таких рослин-регенерантів.

Значний об'єм досліджень пов'язаний з вивченням морфогенетичного потенціалу в калусних культурах лаванди. Унікальною є робота М.Н. Quazi [3], в якій показано можливість розмноження в культурі *in vitro* двох видів лаванди – *L. angustifolia* та *L. latifolia* шляхом соматичного ембріогенезу. М.С. Calvo і J. Segura [4] одержані морфогенні калусні культури з сегментів гіпокотилу *L. latifolia* та *L. stoechas*. В подальших дослідженнях [5] було

досягнуто ефективної регенерації пагонів з калусних клітин *L. latifolia*. В роботі італійських вчених [9] досліджені калусні культури лавандину й визначено фактори регенерації пагонів. М. Tsurо і співавторам вдалося показати, що найбільша ефективність пагоноутворення з листового калусу лаванди (*L. vera* DC.) складала 55,3 % [10]. Н.О. Єгоровою вивчено особливості процесу органогенезу в калусних культурах лаванди і виділено морфогенні штами [8].

Дослідники з Іспанії М.С. Calvo і J. Segura вивчали процеси прямого морфогенезу у *L. latifolia* Medicus в культурі *in vitro* і встановили, що утворення бруньок в листових експлантах [11] та сегментах гіпокотилу [12] відбувається з частотою 80 %. Б.Ш. Алімгазінова і К.Д. Рахімов спостерігали утворення адвентивних пагонів при використанні в якості первинних експлантів фрагментів листків і стебел [13].

Як об'єкт біотехнологічних досліджень лаванда також представляє інтерес у зв'язку з можливістю використання її клітинних суспензій в якості продуцентів вторинних метаболітів: монотерпеноїдів [14], блакитного пігменту [15], розмаринової кислоти [16]. Значно менше фактів стосується клонального мікророзмноження лаванди на основі культури ізольованих меристем. Більша частина літературних даних з цього питання присвячена гормональній регуляції морфогенезу апікальних меристем лаванди *in vitro*, і свідчить про видову та сортову специфічність морфогенетичних реакцій ізольованих меристем лаванди [17-20].

Таким чином, аналіз літератури показує, що тканини та органи лаванди мають здатність до регенерації рослин із калусної тканини шляхом органогенезу або соматичного ембріогенезу, а також до прямого морфогенезу з тканин експланту. Такі факти свідчать про високий морфогенетичний потенціал ізольованих тканин лаванди і вказують на перспективність розробки технології клонального мікророзмноження цінних сортів і унікальних генотипів на основі культури апікальних меристем, яка є найбільш надійною з точки зору одержання генетично ідентичного вихідним формам потомства.

Метою наших досліджень було вивчення особливостей морфогенезу в культурі ізольованих меристем *in vitro* та розроблення технології клонального мікророзмноження лаванди.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріалом для проведення досліджень були рослини лаванди вузьколистої (*Lavandula angustifolia* Mill.) сортів Степова і Синєва та перспективних селекційних зразків 337-9 і 310-17. Донорні рослини вирощували в умовах закритого ґрунту. Як експланти використовували апікальні меристеми висотою 0,2-1,0 мм, які виділяли з верхівкових та пазушних бруньок стебла однорічних рослин. Стерилізацію експлантів проводили послідовним витриманням фрагментів пагонів у 70 %-ному етанолі 40 секунд, 50 %-ному розчині препарату "Брадофен" 12 хвилин, і тричі промивали в автоклавованій дистильованій воді. При проведенні експериментальної роботи застосовували загальноприйняті методи в культурі ізольованих тканин рослин. Для культивування ізольованих меристем та мікроживців використовували як базове живильне середовище Мурасиге і Скуга (МС) [21]. На кожному з етапів клонального мікророзмноження модифікували гормональний склад живильних середовищ відповідно до необхідного шляху морфогенезу, доповнюючи їх кінетином, бензиламінопурином (БАП), гібереловою кислотою (ГК), нафтилоцтовою кислотою (НОК), індолілоцтовою кислотою (ІОК), індолілмасляною кислотою (ІМК). Експланти культивували в термостатованій культуральній кімнаті при температурі 25-26 °С, освітленості 2-3 клк, відносній вологості повітря 60-70 %. Математичну обробку результатів досліджень проводили з використанням методів математичної статистики на персональному комп'ютері за допомогою програми Excel 7.0 з пакету прикладних програм Microsoft Office® для Microsoft Windows®.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У результаті досліджень вивчено особливості морфогенезу ізольованих меристем лаванди сортів Синева, Степова і перспективних селекційних зразків 337-9, 310-17 та розроблено всі етапи технології клонального мікророзмноження цієї культури (табл. 1). Виявлено, що приживлюваність меристем після поверхневої стерилізації складала 96,0-100,0 %. Базовим для індукції морфогенетичних процесів у ізольованих меристем було прийняте живильне середовище МС. Встановлено, що ініціація розвитку меристем лаванди – цитокінінзалежний процес. Оптимальним для регенерації мікропагонів є живильне середовище МС, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л). При вказаному поєднанні гормонів частота регенерації пагонів становила 90,0-100,0 %, відбувся розвиток основного пагону і множинне пагоноутворення з частотою 85,0-100,0 % і кількістю додаткових пагонів на один експлант 3,03-7,81 шт.

Вивчення впливу генотипу на морфогенез ізольованих меристем лаванди показало, що направленість регенераційних процесів у досліджуваних сортів та зразків була подібною, однак виявлені відмінності в строках настання етапів морфогенезу і кількісних показниках основних біометричних параметрів між досліджуваними сортами і селекційними зразками. Відмінності в рості основного і додаткових пагонів різних генотипів лаванди зумовлювали різні коефіцієнти розмноження: у сорту Синева – 1:12,45, у сорту Степова – 1:10,06, у зразку 337-9 – 1:8,55, у зразку 310-17 – 1:7,18.

Дослідження динаміки росту основного пагону і формування додаткових пагонів у меристемних рослин лаванди показало, що логарифмічна фаза росту основного пагону триває з 10-20 до 50 доби культивування, а процеси закладання бруньок відбуваються на 12-20 добу культивування і в подальшому відбувається розвиток додаткових пагонів, а їх кількість за наступні 30 діб збільшується лише на 1-2 штуки. Тому оптимальною тривалістю пасажу на першому етапі клонального мікророзмноження є термін 50 діб.

При вивченні впливу сезонності ізолювання меристем лаванди на їх розвиток встановлено залежність інтенсивності росту основного пагону і формування додаткових пагонів від строку ізолювання, що можна пов'язати з динамікою гормонів в рослині протягом року. Найбільш інтенсивний ріст мікропагонів спостерігався при введенні меристем в фази весняного і осіннього відростання – в квітні і жовтні, оскільки при відновленні росту в бруньках інтенсивно збільшується вміст стимуляторів росту.

На етапі власне мікророзмноження найбільш оптимальний розвиток мікророслин лаванди відбувся, як і на першому етапі, на живильному середовищі МС, доповненому кінетином і ГК в концентрації по 1,0 мг/л. Однак встановлено відмінність розвитку мікророслин на другому етапі: відбувся інтенсивний ріст основних мікропагонів з пазушних бруньок мікроживця, але формувалося лише 2-4 додаткових пагони. При чому на всіх варіантах живильного середовища утворювалися переважно бічні пагони з бруньок нижніх вузлів основних пагонів, а кількість адвентивних пагонів не перевищувала 4,1-7,9 %, тоді як на етапі введення меристем в культуру формувалися переважно адвентивні пагони.

Такі відмінності регенераційних процесів у лаванди очевидні і передбачувані, оскільки на першому та другому етапах клонального мікророзмноження використовуються різні експланти. На першому етапі в культуру *in vitro* вводили ізольовані апікальні меристеми, у яких під дією екзогенних гормонів закладалися зачатки адвентивних пагонів. На другому етапі культивували мікроживці – фрагменти пагонів, що мають вже диференційовані тканини стебла. При введенні мікроживців на живильне середовище відбувалося транспортування гормонів до латеральних бруньок і індукція їх розвитку, а в базальній частині 70,0-80,0 % експлантів утворювався неморфогенний калус світло-коричневого кольору пухкої консистенції, який видаляли при подальшому субкультивуванні. Утворення адвентивних пагонів відбувалося спонтанно лише у 5-8 % експлантів. На жодному з випробуваних середовищ не вдалося стимулювати активну проліферацію адвентивних

пагонів. Достатньо високі коефіцієнти розмноження у лаванди в культурі *in vitro* в наших експериментах були одержані, в основному, за рахунок живцювання основних пагонів. В дослідженнях казахських вчених [13] також виявлено утворення пазушних пагонів на середовищі з БАП 1,0 мг/л. Н.О. Єгорова [20] показала, що на другому етапі можлива регенерація пазушних і адвентивних пагонів, однак частина їх може бути вітрифікованими.

Таблиця 1 – Біотехнологічна схема клонального мікророзмноження рослин лаванди

Етап мікророзмноження	Особливості культивування
<i>1. Ізолювання експланту, введення і ініціація його розвитку в умовах in vitro</i>	<p>Експлант: апікальна меристема 0,2-0,7 мм з однією-двома парами примордіальних листків.</p> <p>Стерилізація рослинного матеріалу: 70 %-ний етанол (40 сек.), 50 %-ний “Брадофен” (12 хв.).</p> <p>Оптимальний строк відбору експлантів: квітень та жовтень.</p> <p>Живильне середовище: МС, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л).</p> <p>Умови культивування: температура 25-26 °С, освітленість 2-3 клк, фотоперіод 16 год., відносна вологість повітря 70 %.</p> <p>Тривалість культивування: 50 діб.</p> <p>Частота регенерації: 90,0-100,0 %.</p> <p>Коефіцієнт розмноження: 1 : 7 - 1 : 12.</p>
<i>2. Власне мікророзмноження</i>	<p>Експлант: мікроживець довжиною 4-8 мм з однією парою листків.</p> <p>Живильне середовище: МС, доповнене кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л).</p> <p>Умови культивування: температура 25-26 °С, освітленість 2-3 клк, фотоперіод 16 год., відносна вологість повітря 70 %.</p> <p>Тривалість культивування: 50 діб.</p> <p>Частота регенерації: 85,7-100,0 %.</p> <p>Коефіцієнт розмноження: 1 : 7 - 1 : 12.</p> <p>Кількість пасажів за рік: чотири.</p>
<i>3. Укорінення мікропагонів</i>	<p>Експлант: мікроживець довжиною 4-8 мм з однією парою листків.</p> <p>Живильне середовище: ½МС, доповнене ІМК (0,5 мг/л) та ІОК (0,5 мг/л) або емістимом С в розведенні 10⁻⁶, або етамоном у концентрації 0,001 %.</p> <p>Умови культивування: температура 25-26 °С, освітленість 2-3 клк, фотоперіод 16 год., відносна вологість повітря 70 %.</p> <p>Тривалість культивування: 50 діб.</p> <p>Частота укорінення: 85,0 – 100,0 %.</p> <p>Кількість мікророслин за рік: 23-208 тис. шт.</p>
<i>4. Адаптація мікророслин до умов in vivo</i>	<p>Субстрат: торф : перліт: ґрунт : пісок 2 : 1 : 1 : 1.</p> <p>Умови культивування: температура 18-20 °С, підживлення розчином</p> <p>Кнопа після посадки і через 14 днів.</p> <p>Тривалість культивування: 60 днів, з них 14 днів під плівковим укриттям при вологості повітря 100 %.</p> <p>Приживлюваність: 90-100 %.</p>

Виявлені нами особливості розвитку зберігалися при подальших субкультивуваннях протягом 10 пасажів – частота множинного пагоноутворення у всіх генотипів коливалася в межах 14,3-77,5 %, а середня кількість додаткових пагонів складала 1,14-4,33 штуки на один експлант. При цьому не відмічено значних коливань коефіцієнту розмноження в різних пасажах і цей показник зберігався на стабільному рівні до 6-8 пасажу. За рік можна провести

чотири пасажі і одержати сумарний вихід рослин-регенерантів з одного експланту від 23 тис. шт. до 208 тис. шт. в залежності від генотипу.

В роботах ряду вчених вказується на те, що досить складним етапом клонального мікророзмноження лаванди є укорінення мікропагонів *in vitro*, оскільки при застосуванні ауксинів у складі живильного середовища частота коренеутворення коливалася в межах 24,1-100,0 % [17] і 70,2-96,9 % [13]. У зв'язку з цим для підвищення ефективності процесу індукції ризогенезу в наших дослідженнях вивчали вплив різних концентрацій і поєднань ауксинів, а також випробували регулятори росту емістим С і етамон. В результаті серії експериментів підібрано оптимальні концентрації стимуляторів росту, які додавали до живильного середовища ½МС. Показано, що поєднання ІМК (0,5 мг/л) та ІОК (0,5 мг/л) дозволяє досягати частоти укорінення 100,0 % у сортів Синєва, Степова і зразку 337-9, та 85,0 % у зразку 310-17.

Найбільш ефективною концентрацією емістиму С визначено розведення 10^{-6} , при якому відбувалося стимулювання коренеутворення у 100,0 % мікроживців лаванди. Застосування етамону в складі живильного середовища для укорінення *in vitro* лаванди стимулювало ризогенез у 92,5-100,0% мікропагонів.

Підібрані в даній роботі умови адаптації мікророслин до умов *in vivo* дозволили забезпечити приживлюваність меристемних рослин на рівні 95,0% у зразку 310-17 і 100,0 % у інших досліджуваних генотипів.

Розроблена нами технологія клонального мікророзмноження лаванди принципово відрізняється від робіт інших дослідників за біотехнологічною схемою. В роботі [17] розроблено три етапи клонального мікророзмноження: введення і мікроклонування, укорінення мікропагонів, адаптації до умов *in vivo*. Очевидно, об'єднуючи введення і мікроклонування в один етап, автори мали на увазі той факт, що у лаванди на етапі введення відбувається утворення додаткових пагонів, які можна використати для укорінення, тим більше, що експериментальних даних про розвиток мікропагонів після мікроживцювання не представлено. На нашу думку, при такому підході нівелюється одна з основних переваг клонального мікророзмноження – високий коефіцієнт розмноження, який досягається на етапі власне мікророзмноження завдяки можливості проведення декількох пасажів. В роботі [20] описані тільки два етапи мікророзмноження лаванди – введення і власне мікророзмноження. На основі проведених нами досліджень розроблені чотири етапи технології клонального мікророзмноження лаванди: ізолювання експланту, введення і ініціація його розвитку в умовах *in vitro*; власне мікророзмноження; укорінення мікропагонів; адаптація мікророслин до умов *in vivo*. Одержаними меристемними рослинами закладено маточник в умовах закритого ґрунту для подальшого вивчення, розмноження і одержання елітних саджанців.

ВИСНОВКИ

Вивчено особливості морфогенезу в культурі ізолюваних апікальних меристем *Lavandula angustifolia* Mill. сортів Синєва, Степова та перспективних селекційних зразків 337-9 і 310-17. На основі результатів досліджень розроблено технологію клонального мікророзмноження і прийоми оздоровлення рослин лаванди.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин: Підручник / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Quazi M.H. *In vitro* multiplication of *Lavandula* spp. / M.H. Quazi // *Ann Bot.* – 1980. – V.45, №3. – P. 361–362.

4. Calvo M.C. In vitro morphogenesis from explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* seedlings / M.C. Calvo, J. Segura // *Scientia Hort.* – 1988. – № 36. – P. 131–137.
5. Calvo M.C. Plant regeneration from isolated cells and *Lavandula latifolia* Medicus / M.C. Calvo, A.M. Jordan, J. Segura // *In Vitro.* – 1988. – № 24. – P. 943–946.
6. Tsuru M. Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC.) / M. Tsuru, M. Koda, M. Inoue // *Sci. hort. (Neth.)*. – 1999. – 81, № 3. – P. 331–336.
7. Новикова В.М. Получение растений в культуре изолированных почек амфигаплоида лаванды / В.М. Новикова, В.Д. Работягов // *Культура клеток растений и биотехнология: Тез. докл. IV Всесоюз. конф.* – Кишинев: Штиинца, 1983. – С. 145.
8. Егорова Н.А. Культура in vitro эфиромасличной лаванды / Н.А. Егорова // *Агробиотехнологии растений и животных: Тез. докл. междунар. конф.* – К, 1997. – С. 92.
9. Sodi A.M. Micropropagazione del lavandino: risposta degli espianti a variazioni indotte nei livelli di etilene / A.M. Sodi, T.F. Panizza // *Societa Orticola Italiana: Giornate Scientifiche* 1992. – Ravello, 1992. – P. 148–149.
10. Tsuru M. Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC.) / M. Tsuru, M. Koda, M. Inoue // *Sci. hort. (Neth.)*. – 1999. – 81, № 3. – P. 331–336.
11. Calvo M.C. Plant regeneration from cultured leaves of *Lavandula latifolia* Medicus: Influence of growth regulators and illumination conditions / M.C. Calvo, J. Segura // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 1989. – 19, № 1. – P. 33–42.
12. Calvo M.C. In Vitro Propagation of Lavender / M.C. Calvo, J. Segura // *Hort-Science.* – 1989. – Vol. 24, № 2. – P. 375–376.
13. Алимгазинова Б.Ш., Рахимов К.Д. Использование культуры тканей в микроразмножении лаванды / Б.Ш. Алимгазинова, К.Д. Рахимов // *Нетрадиционное растениеводство, экология и здоровье: Труды VIII Междунар. симп.* – Симферополь. – 1999. – С. 345.
14. Lappin G.J. Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia* / G.J. Lappin, J.D. Stride, J. Tampion // *Phytochemistry.* – 1987. – V. 26, №4. – P. 995–997.
15. Nakajima H. Enhancement of pigment productivity of immobilized cultured *Lavandula vera* cells by limitation of nitrogen sources / H. Nakajima, K. Sonomoto, F. Sato, K. Ichimura, Y. Yamada, A. Tanaka // *J. Ferment. Technol.* – 1989. – 67, №4. – P. 306–308.
16. Pavlov A.I. Nutrient medium optimization for rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension / A.I. Pavlov, M.P. Ilieva, I.N. Panchev // *Biotechnol. Progr.* – 2000. – 16, №4. – P. 668–670.
17. Разработать технологию выращивания оздоровленного посадочного материала лаванды: Отчет о НИР / ВНИИЭМК. – Симферополь, 1991. – 65 с.
18. Jordan A.M. Micropropagation of adult *Lavandula dentata* plants / A.M. Jordan, M.C. Calvo, J. Segura // *J. hort. Sc. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 73, №1. – P. 93–96.
19. Alimgazinova B.Sh. New technologies in plant breeding / B.Sh. Alimgazinova // *Нетрадиционное растениеводство, экология и здоровье: Труды VIII Междунар. симп.* – Симферополь, 1999. – С. 269–270.
20. Егорова Н.А. Микроразмножение лаванды in vitro / Н.А. Егорова // *Вісник Харківського національного аграрного університету. Сер. Біологія.* – 2002. – №9 (1). – С. 65–71.
21. Murachige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murachige, F. Skoog // *Physiol. plant.* – 1962. – 15, N13. – P. 473–497.