



Матеріали XXV Міжнародної науково-практичної конференції
«Екологія. Людина. Суспільство»
пам'яті д-ра Дмитра СТЕФАНІШИНА
(12 червня 2025 р., м. Київ, Україна)

Proceedings of the XXV International Science Conference
«Ecology. Human. Society»
dedicated to the memory of Dr. Dmytro STEFANYSHYN
(June 12 2025, Kyiv, Ukraine)

ISSN (Online) 2710-3315

<https://doi.org/10.20535/EHS2710-3315.2025.330391>

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН АРАУКАРІЇ З МЕТОЮ ПОДАЛЬШОГО АНАЛІЗУ ЇХ ФІТОРЕМЕДІАЦІЙНОГО ПОТЕНЦІАЛУ

Софія ІВКО¹, Юлія ЛУЧАКІВСЬКА²

¹Київський Палац дітей та юнацтва
вул.Мазепи 13, м. Київ, 01010, Україна

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
вул.Акад.Заболотного 148, м. Київ, 03143, Україна
e-mail: ivkosofiya@gmail.com

Анотація

Дана робота спрямована на аналіз фіторемедіаційного потенціалу рослин араукарії, отриманих в умовах *invitro*. Нами було оптимізовано протокол поверхневої стерилізації експлантів араукарії та мікроклонального розмноження отриманих рослин, проведено їх генетичну *Agrobacterium rhizogeneses*-опосередковану трансформацію з метою стимуляції коренетворення рослин отриманих рослин та розроблено протокол ефективного укорінення рослин з використанням різних регуляторів росту. За попередніми дослідженнями було виявлено, що рослини араукарії здатні знижувати вміст іонів шестивалентного хрому у живильному середовищі до слідових кількостей.

Ключові слова: араукарія, мікроклональне розмноження, *Agrobacterium rhizogeneses*-опосередкована трансформація, фіторемедіаційний потенціал, важкі метали.

Фіторемедіаційні методи мають низку переваг над іншими методами очищення довкілля, оскільки характеризуються невисокою собівартістю та екологічно безпечним застосуванням з огляду на зниження ризику повторного розповсюдження забрудника іможливістю ремедіації одразу кількох забрудників різних типів. В науковій літературі є повідомлення про значний фіторемедіаційний потенціал рослин араукарії зокрема, про їх стійкість до наявності нікелю у ґрунтах, а також про здатність до відновлення хрому [1,2]. Крім того, рослини араукарії характеризуються лікувальними властивостями [3], а також вважаються цінною декоративним видом. В той же час, араукарія – дводомна рослина, тому отримання насіння вкрай утруднене, натомість розмноження рослин в умовах культури *invitro* дозволяє отримати велику кількість генетично однорідного матеріалу, до того ж використання культури *invitro* передбачає роботу з рослинами в стерильних умовах, що дозволяє уникати фунгальних чи бактеріальних заражень рослинного матеріалу.

Метою нашого дослідження було оптимізувати умови стерилізації і введення в культуру рослин араукарії, розробити протоколи їх подальшого укорінення та мікроклонального розмноження, а також проаналізувати здатність отриманих рослин до відновлення іонів

хрому (VI) у живильному середовищі та акумулювання іонів нікелю, свинцю, купруму та кадмію.

Запропонований нами протокол послідовної обробки експлантів (розгалужених ділянок пагонів довжиною приблизно 3-4 см) рослин араукарії 70 % розчином етилового спирту протягом 1 хвилини та 15 % розчином комерційного препарату білизна (2% гіпохлориту натрію) протягом 15 хвилин з подальшим відмиванням експлантів стерильною дистильованою водою протягом 5 хвилин по 4 рази дозволив провести ефективну поверхневу стерилізацію експлантів араукарії з метою подальшого висаджування рослин на живильне середовище. Таким чином, нам вдалося отримати до 75 % життєздатних рослин араукарії в умовах культури *in vitro*.

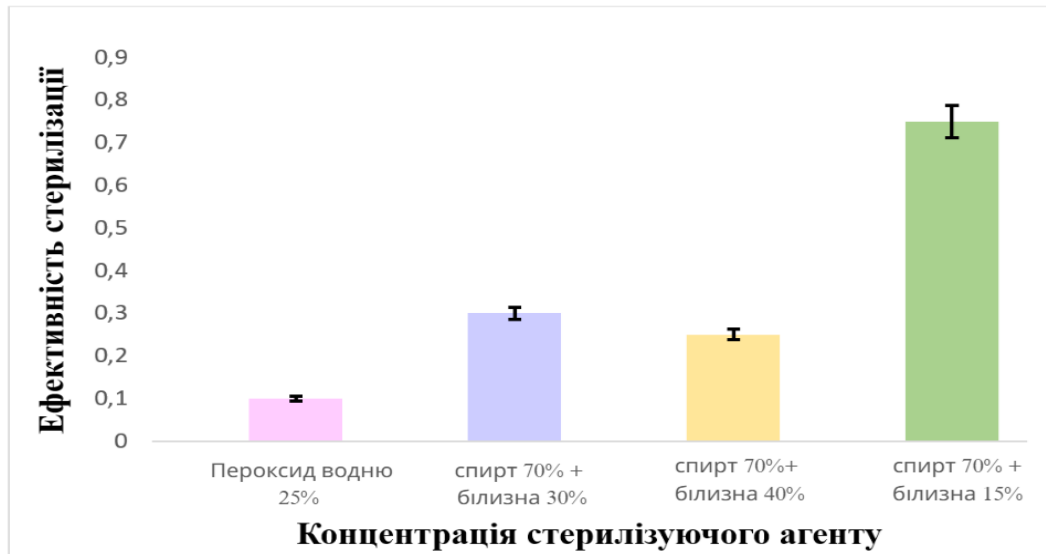


Рис 1. Ефективність стерилізації експлантів рослин араукарії різними стерилізуючими розчинами

Культивування рослин араукарії здійснювалося на живильному середовищі MS за температури 20-22°C при 12-годинному освітленні, при цьому інтервал пасажування складав в середньому 2-3 тижні.



Рис 2. Стерилізовані експланти рослин араукарії в культурі *in vitro*

Для стимуляції коренетворення отримані рослини культивували на середовищах з додаванням регуляторів росту: 0,5 мМ та 1,0 мМ нафтилоцтової кислоти (НОК), 2 мМ індолілоцтової кислоти (ІОК), 2,2 мМ 6-бензиламінопурину (БАП), 0,7 мМ, 0,5 мМ; та 1,0 мМ індолилмасляної кислоти (ІМК). Високу частоту укорінення спостерігали за одночасного додавання 0,7 мМ ІОК та 0,7 мМ ІМК до живильного середовища через 5-6 тижнів після введення рослин араукарії в культуру.

Генетичну *Agrobacterium rhizogeneses*-опосередковану трансформацію отриманих рослин араукарії проводили з метою їх подальшого укорінення [4]. Бактеріальну нічну суспензійну культуру *A. rhizogeneses* (штам А4) осаджували шляхом центрифугування протягом 10 хв, 4000 обертів на хвилину. Потім осаджену бактеріальну культуру ресуспендували у рідкому живильному середовищі MS. Отриману бактеріальну культуру культивували на орбітальному шейкері, протягом 30 хв за температури 28 °С з додаванням 100 мМ ацетосирингону. Далі рослинні експланти араукарії інкубували створеною бактеріальною культурою, генетична трансформація проходила протягом 24 годин при розсіяному світлі. В подальшому експланти переносили на живильне середовище MS [4] з додаванням 400 мг/л антибіотику цефотаксиму для елімінації бактерій.

Таблиця 1. Частота укорінення рослини араукарії при застосуванні регуляторів росту

Концентрація фітогормонів у живильному середовищі, мМ	Тривалість культивування рослин, тижні	Частота укорінення експлантів, %
0,5 НОК + 0,5 ІМК	5 – 6	15
1,0 НОК + 1,0 ІМК	5 – 6	25
2 ІОК	3 – 4	5
2,2 БАП	3 – 4	5
0,7 НОК + 0,7 ІМК	5 – 6	75

Наукові публікації [5]свідчать про ефективність застосування *Agrobacterium rhizogeneses*-опосередкованої трансформації для стимуляції коренетворення рослин араукарії, тому в подальшому плануємо оптимізувати наведений протокол, оскільки в наших дослідженнях такий варіант не сприяв укоріненню рослини.

В науковій літературі є повідомлення про значний фіторемераційний потенціал араукарії рослин – зафіксовані випадки зростання рослин на ґрунтах з підвищеним вмістом нікелю, що може свідчити про їх стійкість до наявності нікелю у ґрунтах, а також є повідомлення про їх здатність до відновлення хрому [1,2]. З метою оцінки здатності рослин араукарії до відновлення шестивалентного хрому отримані рослини культивували у рідкому живильному середовищі MS з додаванням хрому (VI) у концентраціях: 2 ГДК, 6 КДК та 12 ГДК на орбітальному шейкері протягом 5 діб. Обрані концентрації були запропоновані з огляду на опубліковані дані вмісту хрому (VI) у р. Дніпро (від 2 до 12 ГДК) [6]. Вміст хрому (VI) визначали спектрофотометрично з використанням дифенілкарбазиду. Попередні дослідження показали зниження вмісту іонів хрому до слідових кількостей в середовищі, яке містило 2 ГДК, на 3 добу культивування, а також зниження вмісту шестивалентного хрому до слідових кількостей на 4 добу проведення досліду у випадку застосування високих концентрацій хроматів – 6 та 12 ГДК.

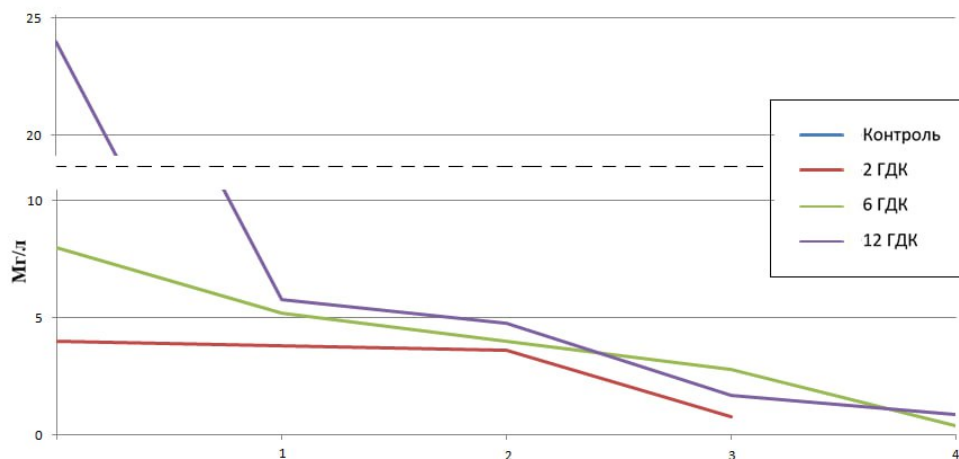


Рис 3. Динаміка зниження вмісту хрому (VI) у середовищі протягом 4 діб

З метою оцінки здатності рослин араукарії до акумуляції важких металів свинцю, нікелю, купруму та кадмію рослини культивували на середовищах з додаванням перелічених металів у концентраціях 5-8 ГДК нікелю, 10-15 ГДК свинцю, 3-7 ГДК купруму і 2-5 ГДК кадмію (обрані концентрації підбирали з огляду на аналіз вмісту важких металів у водоймах та ґрунтах України [6]). Через 7 діб культивування рослини відмивали та висушували за температури 28 °С, рослинний матеріал подрібнювали, та визначали концентрації кислоторозчинних (після вилучення 1,0 н HCl, 0,1 н H₂SO₄) та рухомих (після вилучення ацетатно-амонійним буферним розчином рН 4,8) форм важких металів методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії для оцінки фіторе mediaційного потенціалу рослини араукарії.

Література

1. Barbosa JZ, Constantino V, Zanette F et al (2017) Soil fertility affects elemental distribution in needles of the conifer *Araucaria angustifolia*: a microanalytical study. // CERNE 23:257–266. <https://doi.org/10.1590/0104776020172302313>
2. Bertolotti G, Gialanella S (2014) Review: use of conifer needles as passive samplers of inorganic pollutants in air quality monitoring. // Anal.Methods 6:6208–6222. <https://doi.org/10.1039/c4ay00172a>
3. Kulshrestha R., Ramasamy S. (2024) Phytochemical and pharmacological aspects of *Araucaria heterophylla*. // Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences 13(2): 49–54.
4. Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays tissue cultures // Physiol. Pl. – №15. – P. 473–497.
5. Gutierrez-Valdes N et al. (2020) Hairy Root Cultures—A Versatile Tool With Multiple Applications. // Front. Plant Sci. 11:33. doi: 10.3389/fpls.2020.00033
6. Наказ Міністерства охорони здоров'я України № 721 Про затвердження гігієнічних нормативів якості води водних об'єктів для задоволення питних, господарсько-побутових та інших потреб населення від 02.05.2022 <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0524-22#Text>

**MICROCLONAL REPRODUCTION OF ARAUCARIA PLANTS FOR THE ANALYSIS
OF THEIR PHYTOREMEDIATION POTENTIAL**

Sofiia IVKO

Kyiv Palace of Children and Youth

Mazepa st., 13, Kyiv, 01010, Ukraine

<https://orcid.org/0009-0002-1117-5917>

Yuliya LUCHAKIVSKA

Institute of Cell biology and genetic Engineering NAS of Ukraine

Acad.Zabolotnogo st., Kyiv, 03143, Ukraine

<https://orcid.org/0000-0002-3294-2954>

Abstract

This work is devoted to the analysing of phytoremediation potential of araucaria in vitro plants. We have optimized the protocol of sterilization of araucaria explants and micropropagation of the obtained plants, we've also carried out their genetic Agrobacterium rhizogenezes-mediated transformation in order to stimulate root formation of the obtained plants and developed a protocol for effective rooting of plants using various growth regulators. Our preliminary studies have shown the araucaria plants to be able to reduce the concentration of Cr VI ions to their trace amounts in the culture media.

Keywords: araucaria, microclonal reproduction, Agrobacterium rhizogenezes-mediated transformation, phytoremediation potential, heavy metals.