

Ключевые слова: газонные покрытия, райграс многолетний, сорт, фенольный комплекс, флавоноиды.

*The flavonoid content in plant leaves of perennial ryegrass of five varieties of domestic breeding was analyzed by methods of thin-layer chromatography and spectrophotometry. It was found that the plants variety 'Leta' contain atypical for other varieties of Ukrainian selection individual compound (indication $R_f \sim 0,29$). It was established experimentally that the flavonoids content in leaves of *Lolium perenne* L. of five varieties varies from 1,44 to 1,89 mg / g. Recorded that the high flavonoid content inherents to plant varieties 'Svyatoshinskiy' and lowest □ Orion'.*

Key words: lawns, perennial ryegrass, variety, phenolic complex, flavonoids.

УДК 57.085.2:674.031.772.224.2

ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ КУЛЬТИВАРІВ РОСЛИН *ACER PLATANOIDES* L. IN VITRO

М. В. Манько, аспірант*

**О. Ю. Чорнобров, кандидат сільськогосподарських наук,
Н. О. Олексійченко, доктор сільськогосподарських наук, професор**
e-mail: acerplatvariety@gmail.com; oksana_chornobrov@ukr.net;
noolex@bigmir.net

*Визначено оптимальні способи отримання асептичних життєздатних експлантатів культиварів рослин *Acer platanoides* 'Princeton Gold', А. р. 'Royal Red', А. р. 'Crimson King', А. р. 'Cleveland', А. р. 'Drummondii', А. р. 'Columnare', А. р. 'Globosum' та А. р. 'Rubrum' за різних фенофаз донорів шляхом добору відповідних режимів стерилізації.*

Ключові слова: *Acer platanoides* L., культивар, експлантат, культура in vitro, стерилізація, асептична культура, живильне середовище.

Клен гостролистий (*Acer platanoides* L.) вперше було введено в культуру у Великій Британії в Королівському ботанічному саду Единбурга: Джеймс Сазерленд включив А. р. 'Laciniatum' у свій *Hortus Medicus Edinburgensis* у 1683 р. [1]. Перша документальна згадка про інтродукцію клена гостролистого на територію американського континенту належить Джону Бартраму (Філадельфія, США), який у 1756 р. у листі до Філіпа Міллера (Англія) попрохав останнього вислати насіння [2].

Нині у світі відомо більше ніж 150 культиварів виду, які набули великої популярності в озелененні міст як Європи, так і Америки завдяки стійкості до шкідників та хвороб, толерантності до міського забруднення

та ущільнених ґрунтів, а також привабливості архітектоніки крони та різноманітного забарвлення листя [3, 4]. Рослина добре розмножується насінням. Для культиварів практикується розмноження живцями та щепленням, але через низьку регенераційну здатність бруньок ці методи трудомісткі та малоефективні [5], тому у світовій практиці широкого використання набув метод культури ізольованих тканин рослин *in vitro* [6]. За кордоном це питання досліджують учені Румунії, Словаччини, Чехії, Великої Британії, Фінляндії та США. Важливим етапом при розмноженні рослин зазначеним методом є стерилізація рослинного матеріалу, від якості якої залежить успіх подальшого культивування. В закордонних статтях цей етап або взагалі опускають, або висвітлюють досить коротко [5, 7, 8, 9, 10]. Інформації про проведення подібних досліджень на території України немає.

Метою досліджень було відпрацювання способів отримання асептичної культури рослин культиварів *A. p.* 'Princeton Gold', *A. p.* 'Royal Red', *A. p.* 'Crimson King', *A. p.* 'Cleveland', *A. p.* 'Drummondii', *A. p.* 'Columnare', *A. p.* 'Globosum' та *A. p.* 'Rubrum' за різних фенофаз рослин-донорів.

Матеріали і методика досліджень. Для проведення досліджень застосовували частини однорічних пагонів, ізольованих із 5–8-річних рослин-донорів. Як експлантати I використовували фрагменти мікропагонів, отримані шляхом штучної активації меристем у лабораторних умовах (лютий–березень); як експлантати II – мікропагони, відібрані у фенофазі початку облистнення (квітень–травень); експлантати III – мікропагони, ізольовані у фенофазі повного облистнення (червень–липень).

Стерилізація рослинного матеріалу відбувалася у два етапи. На етапі попередньої стерилізації експлантати витримували у мильному розчині з декількома краплями Tween®80 з наступним відмиванням у проточній воді упродовж 15–20 хв. В умовах особливо чистого приміщення для попередньої стерилізації експлантати занурювали у 70 % етиловий спирт (C_2H_5OH) на 30–40 с. Як стерилізуючі речовини використовували 0,1 % розчин дихлориду ртуті ($HgCl_2$) (тривалість експозиції – 5, 7, 8, 10 хв), 3 % перекис водню (H_2O_2) (10, 15 хв), 1 % нітрат срібла ($AgNO_3$) (5, 10 хв) та 2,5 % гіпохлорит натрію ($NaClO$) (5, 10 хв).

Застосовували загальноприйнятну методику відмивання рослинного матеріалу від стерилізуючих речовин [11, 12]. Оскільки перекис водню досить швидко розкладається і не є токсичним для рослинних тканин, але водночас за даними джерел [11, 12] менш ефективним для знезараження екзогенної мікрофлори порівняно із вищезазначеними речовинами, тому використовували два режими відмивання: загальноприйнятний (1 раз впродовж 10 хв) та модифікований нами (без відмивання).

Стерильними інструментами частини пагонів нарізали на фрагменти завдовжки 5–15 мм. Асептичні умови створювали за методами, загальноприйнятими у біотехнології [11, 12]. Експлантати культивували на базовому безгормональному живильному середовищі за прописом

Мурасіге і Скуга (МС) [13]. На етапі введення у культуру *in vitro* як сорбент використовували активоване вугілля ($1-2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) або полівінілпіролідон (ПВП) ($2,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). Рослинний матеріал культивували у культуральній кімнаті за температури $24 \pm 2^\circ\text{C}$ і освітлення $2,0-3,0 \text{ клк}$ з 16-годинним фотоперіодом та відносною вологістю повітря 70–75 %. Статистичне опрацювання експериментальних даних виконували з використанням пакета аналізу MS Excel. У таблиці наведено середні арифметичні значення та їхні стандартні похибки.

Результати досліджень. Аналіз кількості стерильних та інфікованих експлантатів II на 30 добу культивування показав, що використання як стерилізуючих речовин 1 % AgNO_3 та 2,5 % NaClO (за досліджуваних експозицій) є недоцільним (рис., а).

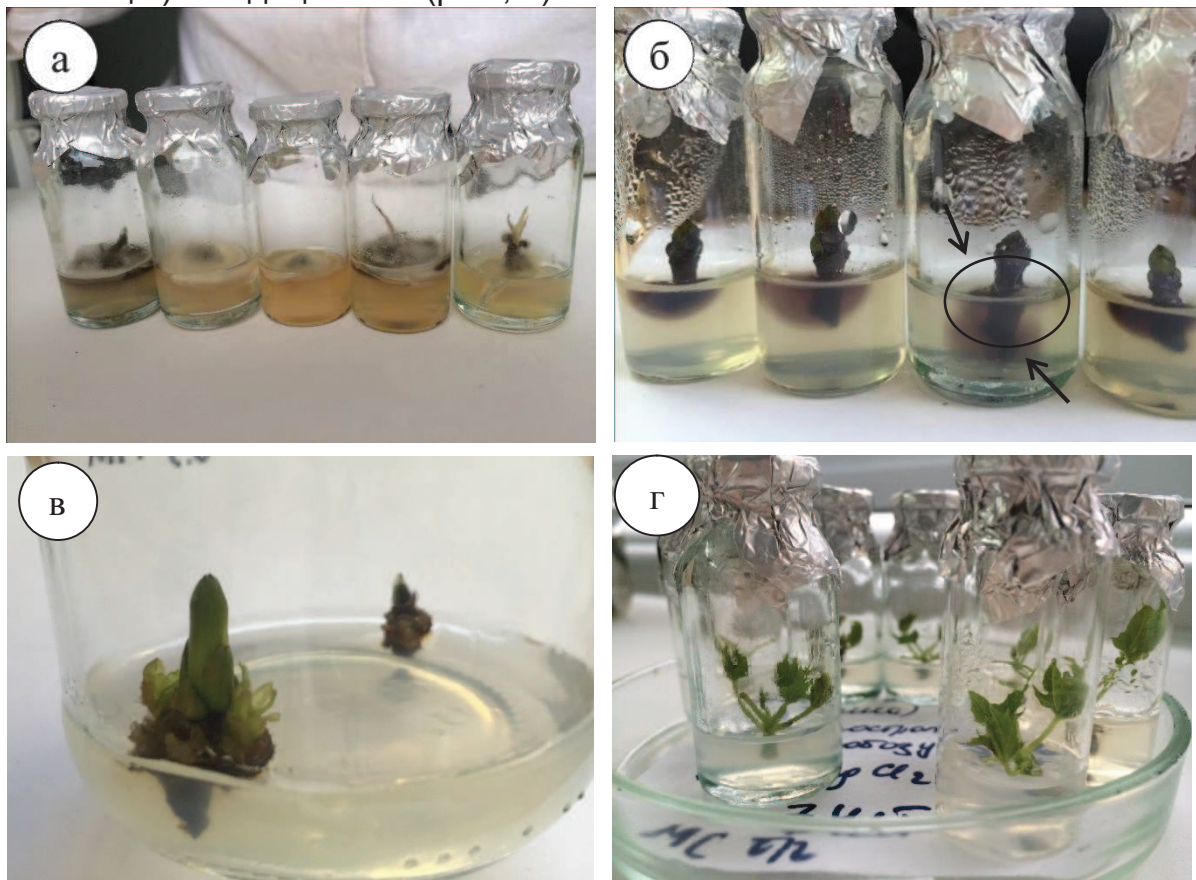


Рис. Послідовність етапів отримання мікропагонів рослин *Acer platanoides* 'Globosum' у культурі *in vitro*:

а) інфіковані експлантати, 9 доба культивування; б) нежиттєздатні експлантати (стрілками показано виділення вторинних метаболітів у основи експлантата); в) асептичні життєздатні експлантати; г) мікропагони рослини, 16-та доба культивування.

Так, використання експозиції 5 хв не дає змоги одержувати понад 50 % асептичних життєздатних мікропагонів, а у разі збільшення тривалості витримування рослинного матеріалу до 10 хв відсоток асептичності збільшувався, однак більшість експлантатів ($76,0 \pm 2,9$ % при використанні 2,5 % NaClO та $91,1 \pm 1,6$ % при використанні 1 % AgNO_3)

виявилися нежиттєздатними та всі – нерегенераційноздатними (табл.). При застосуванні стерилізуючих речовин упродовж 10 хв ефективність стерилізації була надзвичайно малою (становила $24,0 \pm 2,9$ % та $8,9 \pm 1,6$ % для NaClO та AgNO₃ відповідно), а також фіксувалося активне виділення вторинних метаболітів (рис., б).

Малоефективним також виявився варіант стерилізації експлантатів перекисом водню за експозиції 10 хв із наступним відмиванням у стерильній дистильованій воді. Так, для експлантатів I ефективність стерилізації за цього режиму становила $21,3 \pm 4,5$ %, для експлантатів II дещо менше – $20,6 \pm 3,1$ %. При застосуванні 0,1 % HgCl₂ за експозиції 5 хв відсоток стерильних життєздатних експлантатів I був незначним ($18,7 \pm 6,8$ %). Невисокий показник ($31,8$ %– $53,0$ %) стерилізації експлантатів II зафіксовано за використання вищезазначеної речовини за експозиції 7 хв (табл.).

Ефективність стерилізації експлантатів рослин 8 культиварів *A. platanooides* за різних фенофаз рослин-донорів

Ва-ріант	Режим стерилізації експлантатів	Ефективність стерилізації рослин, %		
		експлантати I	експлантати II	експлантати III
1	2,5 % NaClO протягом 5 хв	-	$41,3 \pm 8,4$	-
2	2,5 % NaClO протягом 10 хв	-	$24,0 \pm 2,9$	-
3	1 % AgNO ₃ протягом 5 хв	-	$40,5 \pm 3,1$	-
4	1 % AgNO ₃ протягом 10 хв	-	$8,9 \pm 1,6$	-
5	0,1 % HgCl ₂ протягом 5 хв	$18,7 \pm 6,8$	-	-
6	0,1 % HgCl ₂ протягом 7 хв	$84,9 \pm 2,6$	$42,4 \pm 10,6$	-
7	0,1 % HgCl ₂ протягом 8 хв	$52,3 \pm 5,9$	$85,0 \pm 5,1$	$56,3 \pm 2,9$
8	0,1 % HgCl ₂ протягом 10 хв	-	$44,6 \pm 6,2$	$82,3 \pm 6,0$
9	3 % H ₂ O ₂ протягом 10 хв з відмиванням	$21,3 \pm 4,5$	$20,6 \pm 3,1$	-
10	3 % H ₂ O ₂ протягом 10 хв без відмивання	$67,7 \pm 2,0$	$65,5 \pm 8,9$	$46,8 \pm 5,3$
11	3 % H ₂ O ₂ протягом 15 хв без відмивання	-	-	$60,4 \pm 2,7$

Загалом високий показник стерилізації експлантатів I та II ($67,7 \pm 2,0$ % та $65,5 \pm 8,9$ % відповідно) отримали при застосуванні 3 % H₂O₂ упродовж 10 хв без відмивання у стерильній дистильованій воді (при відмиванні ефективність стерилізації зменшувалася у 3,2 разу – відмінність статистично значуща за $\alpha=0,05$). Для експлантатів III вище наведений режим стерилізації виявився малоефективним ($46,8 \pm 5,3$ %). При збільшенні часу експозиції до 15 хв ефективність стерилізації експлантатів III зростала до $60,4 \pm 2,7$ % (рис., в).

Експлантати I найдоцільніше витримувати у 0,1 % HgCl₂ упродовж 7 хв, де ефективність становила понад 80 % (рис., г). Для експлантатів II збільшення експозиції до 8 хв підвищувало ефективність стерилізації у 2

рази (відмінність статистично значуща за $\alpha=0,05$) порівняно із 7 хв. Для експлантатів III вагомий результат ($82,3\pm 6,0\%$) одержали за використання режиму стерилізації, який передбачає витримування у 0,1 % HgCl_2 упродовж 10 хв.

Отже, в результаті проведених досліджень відпрацьовано способи стерилізації експлантатів 8 культиварів рослин *A. platanoides in vitro* за різних фенофаз донорів, що дало змогу одержати значну кількість асептичного життєздатного рослинного матеріалу. Отримані мікропагони використовують для дослідження регенераційної здатності тканин та органів на модифікованих живильних середовищах для масового мікроклонального розмноження.

Висновки

Відпрацьовано способи стерилізації експлантатів 8 культиварів рослин *A. platanoides in vitro* (*A. p.* 'Princeton Gold', *A. p.* 'Royal Red', *A. p.* 'Crimson King', *A. p.* 'Cleveland', *A. p.* 'Drummondii', *A. p.* 'Columnare', *A. p.* 'Globosum' та *A. p.* 'Rubrum') за різних фенофаз рослин-донорів.

Найефективнішої стерилізації експлантатів (понад 80 %), ізольованих за різних фенофаз рослин-донорів культиварів *Acer platanoides* L., досягнуто шляхом застосування 0,1 % HgCl_2 за різної експозиції. Так, експлантати, отримані шляхом штучної активації меристем у лабораторних умовах (лютий– березень), доцільно витримувати упродовж 7 хв. Рослинний матеріал, ізольований у фенофазі початку облистнення донорів (квітень–травень) – 8 хв; експлантати відібрані у фазі повного облистнення (червень–липень) – 10 хв.

Список літератури

1. Nowak D. J. History and range of Norway maple / D. J. Nowak, R. A. Rowntree // J. of Arboriculture. – 1990. – Vol. 16(1). – P. 291–296.
2. Leighton A. American gardens in the eighteenth century / A. Leighton. – Houghton Mifflin Company, Boston, 1976. – 514 p.
3. Chaney W. R. *Acer platanoides* : Norway maple / W. R. Chaney. – Arbor Age, 1995. – P. 22–23.
4. Santamour F. S. Checklist of cultivated maples. III. *Acer platanoides* L. / F. S. Santamour, A. J. McArdle // J. of Arboriculture. – 1982. – Vol. 8 (9). – P. 241–246.
5. Concioiu M. E. Preliminary results regarding *in vitro* behavior of two *Acer* varieties during the initiation phase [Electronic resource] / M. E. Concioiu, A. Teodorescu. – Mode of access: http://www.upit.ro/uploads/facultatea_st/CTNS_1_/Paper%202.pdf.
6. Concioiu M. E. Biotic and abiotic factors influence during the *in vitro* multiplication phase of some species and cultivars of the *Acer* genus / M. E. Concioiu, M. Duță, M. I. Oprea // Current Trends in Natural Sciences. Seria Agronomie – 2012. – Vol. 55 (2). – P. 313–315.
7. Concioiu M. E. In vitro behaviour of 'Globosum' and 'Crimson King' *Acer platanoides* ornamental varieties during initials stage / M. E. Concioiu,

M. Duță, M. I. Oprea, A. Teodorescu // Scientific Papers of the R. I. F. G. Pitesti. – 2010. – Vol. XXVI. – P. 152–155.

8. Rovina E. A. In vitro regeneration capacity of the ornamental varieties related to the cultural media / E. A. Rovina, M. Călinescu, C. Plopa, V. Isac // Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology. – 2010. – Vol. 14, № 1. – P. 13–18.

9. Jason D. Lattier. Micropropagation and polyploid induction of *Acer platanoides* 'Crimson Sentry' / J. D. Lattier, D. H. Touchell, T. G. Ranney, J. C. Smith // J. Environ. Hort. – 2013. – № 31 (4). – P. 246–252.

10. Ďurkovič J. In vitro regeneration of Norway maple (*Acer platanoides* L.) / J. Ďurkovič // Biologia Plantarum. – 1996. – № 38. – P. 303–307.

11. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе : учеб. пос. / Р. Г. Бутенко. – М. : ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.

12. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К. : Наук. думка, 1980. – 488 с.

13. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – № 13. – P. 473–497.

*Определены оптимальные способы получения асептических жизнеспособных эксплантов культиваров растений *Acer platanoides* 'Princeton Gold', A. p. 'Royal Red', A. p. 'Crimson King', A. p. 'Cleveland', A. p. 'Drummondii', A. p. 'Columnare', A. p. 'Globosum' и A. p. 'Rubrum' при различных фенофазах доноров путем отбора соответствующих режимов стерилизации.*

Ключевые слова: *Acer platanoides* L., культивар, эксплантаты, культура *in vitro*, стерилизация, асептическая культура, питательная среда.

*The optimal ways of obtaining viable aseptic explants of cultivars *Acer platanoides* 'Princeton Gold', A. p. 'Royal Red', A. p. 'Crimson King', A. p. 'Cleveland', A. p. 'Drummondii', A. p. 'Columnare', A. p. 'Globosum' and A. p. 'Rubrum' with various donors phenophase by selecting the appropriate mode of sterilization were defined.*

Key words: *Acer platanoides* L., cultivar, explants, *in vitro* culture, sterilization, aseptic culture, nutrient medium.