

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН *SALIX MATSUDANA* KOIDZ. 'TORTUOSA' REHD.

**О. Ю. Чорнобров, кандидат сільськогосподарських наук
Відокремлений підрозділ Національного університету
біоресурсів і природокористування України
«Боярська лісова дослідна станція»**

Визначено способи одержання асептичних життєздатних експлантатів рослин *Salix matsudana* Koidz. 'Tortuosa' Rehd., ізольованих із донорів у різні фенофази та оптимальні умови калюсоутворення в тканинах експлантатів із частотою понад 90 %. Розроблено біотехнологію мікроклонального розмноження рослин, яка включає добір компонентів живильних середовищ для різних етапів і типів морфогенезу та дає змогу одержувати у стислі терміни значну кількість регенерантів для їх подальшого застосування в озелененні.

Ключові слова: *salix matsudana* Koidz. 'Tortuosa' Rehd., культура *in vitro*, експлантати, мікроклональне розмноження, калюс, живильне середовище, рослини-регенеранти.

Нині значну популярність серед декоративних видів займають представники родини *Salicaceae* Mirb., зокрема *Salix matsudana* Koidz. 'Tortuosa' Rehd. – звивиста форма з химерно закрученими пагонами фісташково-сірого забарвлення і нібито зім'ятими листками. Інтродуцент, завезена до України з Кореї та Китаю. Рослини широко використовують в оформленні алей, входів у парки чи сквери, а пагони незвичайної форми застосовують як матеріал для зимових букетів і композицій. Традиційно розмножують живцями. Нині метод культури ізольованих клітин, тканин і органів рослин *in vitro* дає змогу якнайповніше реалізувати потенціал рослинної клітини до вегетативного розмноження і є головною складовою біотехнологій клонування *in vitro* у лісівництві [1, 2, 4, 5, 6, 7]. Хоча технологія прискореного розмноження *in vitro* для багатьох видів родини *Salicaceae* розроблена достатньо [4, 6, 7], дослідження щодо рослин *S. matsudana* 'Tortuosa' відсутні.

Мета досліджень – розроблення біотехнології мікроклонального розмноження рослин *S. matsudana* 'Tortuosa' для масового отримання регенерантів із наступним їх використанням в озелененні.

Матеріали та методика досліджень. Для досліджень використано частини однорічних пагонів завдовжки 10–15 см, які добирали з п'ятирічних рослин-донорів *S. matsudana* 'Tortuosa' (рис. 1, а). Як експлантати I використовували мікропагони завдовжки 10–15 мм, отримані шляхом штучної активації меристем у лабораторних умовах у лютому; експлантати II – ізольовані у квітні – червні з природних умов.

Стерилізацію рослинного матеріалу проводили такими розчинами: 70 %-вим етиловим спиртом (1 хв), 2,5 %-вим NaClO (10–20 хв), 1 %-вим AgNO₃ (10–20 хв), 0,1 %-вим HgCl₂ (5–10 хв). Асептичні умови створювали за методами, загальноприйнятими в біотехнології [1, 2, 3].

Регенераційну здатність тканин і органів *S.matsudana* 'Tortuosa' *in vitro* досліджували на живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга (МС) (Murashige T., Scoog F., 1962) [8] із додаванням регуляторів росту ауксинового (0,1–2,0 мг·л⁻¹ ІОК, 1,0–2,0 мг·л⁻¹ 2,4-Д) та цитокінінового (0,5–2,0 мг·л⁻¹ БАП, 0,1–2,0 мг·л⁻¹ кінетину) типів дії. До живильних середовищ вносили 100 мг·л⁻¹ мезоінозитулу, 30 г·л⁻¹ сахарози, 2 г·л⁻¹ активованого вугілля та 6,7–7,0 г·л⁻¹ агару мікробіологічного. Калюсну тканину одержували зі стерильних листових пластинок (0,40–0,50 см²) і частин мікропагонів (0,5–0,8 см). Показник кислотності середовища (рН) доводили до рівня 5,7–5,9. Рослинний матеріал культивували у світловому приміщенні й термостаті ТС-80 за температури +25 ± 1 °С та освітлення 2,0–3,0 клк із 16-годинним фотоперіодом та відносною вологістю повітря 70–75 %. У таблиці наведені середні арифметичні значення та їх стандартні похибки.

Результати досліджень. Нині розроблено значну кількість способів стерилізації експлантатів рослин, однак її методологія підбирається експериментально під кожний об'єкт, залежно від чутливості тканин. Тому для досягнення поставленого завдання використовували широкий спектр стерилізуючих речовин із різною експозицією. Варіанти стерилізації експлантатів, ізольованих із рослин-донорів *S. matsudana* 'Tortuosa' в різні фенофази та отримані результати наведено в таблиці.

Ефективність стерилізації експлантатів рослин *S. matsudana* 'Tortuosa'

Варіант	Режим стерилізації експлантатів	Ефективність стерилізації рослин, %	
		експлантати I	експлантати II
1	2,5 % NaClO впродовж 10 хв	70,0 ± 10,4	14,3 ± 4,7
2	2,5 % NaClO впродовж 20 хв	0	50,0 ± 10,4
3	1 % AgNO ₃ впродовж 10 хв	80,0 ± 8,7	21,7 ± 4,4
4	1 % AgNO ₃ впродовж 20 хв	0	35,0 ± 8,7
5	1 % AgNO ₃ впродовж 10 хв із наступним витриманням у 2,5 % NaClO	0	90,0 ± 7,6
6	0,1 % HgCl ₂ впродовж 5 хв	86,7 ± 8,3	11,7 ± 4,4
7	0,1 % HgCl ₂ впродовж 10 хв	23,3 ± 7,3	71,7 ± 11,7

За нашими спостереженнями, більшу частину (70 %) інфікування експлантатів I і II рослин *S. matsudana* 'Tortuosa' становило грибне

(3–8-ма доба культивування) (рис. 1, б), на бактеріальне припало лише 10 % (проявлялося дещо пізніше, на 6–11-ту добу), змішаний тип інфікування охопив близько 20 % (2–15-та доба).

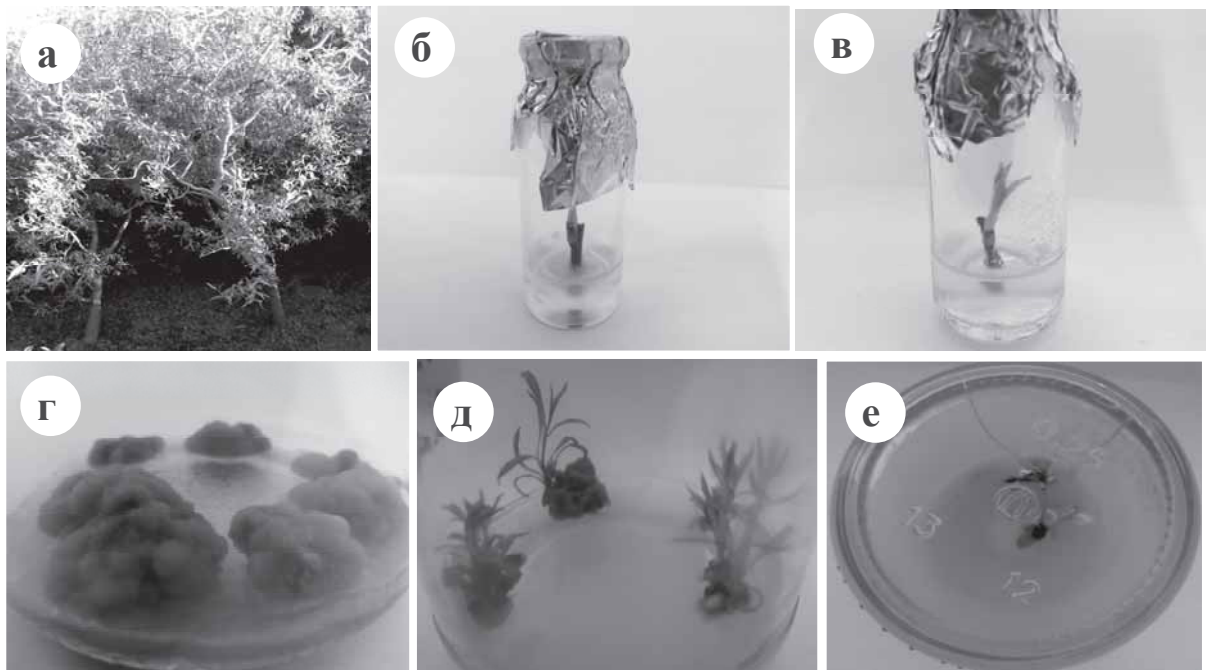


Рис. 1. Послідовність одержання рослин-регенерантів *S. matsudana* 'Tortuosa' за використання культури ізолюваних тканин *in vitro*: а) рослини-донори; б) інфіковані експлантати, 10-та доба культивування; в) асептичні життєздатні експлантати, 25-та доба культивування; г) калюсна тканина рослин, отримана з листових пластинок на МС з $2,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ 2,4-Д; д – мікропагони на МС з додаванням $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП і кінетину; е) коренева система рослин на МС $0,25 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ кінетину й $2 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ активованого вугілля

У результаті проведених досліджень встановлено, що для експлантатів I недоцільно використовувати кілька речовин (варіант 5), препарати, що містять ртуть (варіант 7), срібло (варіант 4) та хлор (варіант 2) з експозиціями понад 10 хв., оскільки за таких умов ефективність стерилізації була невисокою. За витримування їх у 2,5 % NaClO (варіант 1) або 1 % AgNO₃ (варіант 3) впродовж 10 хв, фіксували в цілому високий відсоток асептичних життєздатних мікропагонів. Доволі значний відсоток ефективності стерилізації експлантатів I отримали за використання 0,1 % розчину HgCl₂ з експозицією 5 хв, який становив $86,7 \pm 8,3$ % (варіант 7).

Визначено, що використання режимів стерилізації експлантатів II 1, 3 й 6 є недоцільним, оскільки у цих процедурах фіксували надзвичайно малу її ефективність. У разі використання таких варіантів знезараження експлантатів II, як 2 та 4, кількість асептичних життєздатних експлантатів становила $50,0 \pm 10,4$ % і $35,0 \pm 8,7$ %, відповідно. У цілому високий

досліджуваний показник стерилізації культури ($71,7 \pm 11,7$ %) отримали при застосуванні $0,1$ % HgCl_2 упродовж 10 хв. Витримування їх у $0,1$ %-му розчині HgCl_2 10 хв, порівняно з 5 хв, призвело до збільшення відсотка асептичності рослинного матеріалу у $6,1$ раза (відмінність статистично значуща за $\alpha = 0,05$). Достатньо значний відсоток ефективності стерилізації експлантатів (понад 90 %) одержали за умови застосування ступінчастого способу, який полягав у почерговому витримуванні рослинного матеріалу впродовж 10 хв у 1 %-му AgNO_3 з наступним перенесенням у $2,5$ %-й NaClO .

Результати експериментів із дослідження регенераційної здатності експлантатів рослин *S. matsudana* 'Tortuosa' показали доцільність використання живильного середовища МС як базового. Так, активацію наявних меристем експлантатів фіксували на 16 – 22 -гу добу культивування на безгормональному живильному середовищі МС. На 23 – 30 -ту добу ми одержали мікропагони рослин *S. matsudana* 'Tortuosa' завдовжки $1,5$ – $2,5$ см із характерною пігментацією (рис. 1, в).

Достатньо високу частоту калюсоутворення (понад 90 %) у тканинах рослин *S. matsudana* 'Tortuosa' одержали на живильному середовищі з $2,0$ мг·л⁻¹ 2,4-Д і $0,2$ мг·л⁻¹ БАП для фрагментів листових пластинок та на $2,0$ мг·л⁻¹ 2,4-Д – мікропагонів (рис. 1, г). Надзвичайно малий досліджуваний показник (менше, ніж 20 %) у експлантатів виявляли на таких варіантах: $1,0$ мг·л⁻¹ ІОК та на $0,5$ мг·л⁻¹ 2,4-Д і $1,0$ мг·л⁻¹ ІОК. Калюс, отриманий з різних типів експлантатів, не відрізнявся за пігментацією та консистенцією: був світло-жовтий і пухкий.

Інтенсивне мікропагоноутворення рослин шляхом прямого морфогенезу виявляли на МС із додаванням $0,5$ мг·л⁻¹ БАП і кінетину. За таких умов коефіцієнт розмноження становив (4 – 8) за 30 -добовий цикл культивування (рис 1, д). Візуально це виявлялося на 3 – 6 -ту добу культивування як набухання й потовщення основи мікропагона, після чого відбувалось її розшарування. На 9 – 12 -ту добу культивування спостерігали наявність адвентивних бруньок. Дещо меншу кількість мікропагонів одержали за використання $2,0$ мг·л⁻¹ БАП чи кінетину (коефіцієнт розмноження 3 – 5 і 4 – 6 , відповідно).

Значні результати з регенерації експлантатів шляхом активації росту наявних меристем експлантата одержано на живильному середовищі з $0,25$ мг·л⁻¹ кінетину й 2 г·л⁻¹ активованого вугілля за 45 -добовий цикл культивування. У такому разі довжина мікропагона і кореневої системи становила, відповідно $2,0$ – $4,5$ см й $1,5$ – $2,6$ см (рис. 1, е).

Отже, у результаті проведених досліджень розроблено біотехнологію мікроклонального розмноження рослин *S. matsudana* 'Tortuosa', яка включає різні типи морфогенезу *in vitro* та дає змогу одержувати в стислі терміни значну кількість рослин-регенерантів. Подальші дослідження спрямовані на розробку ефективного способу адаптації рослин до умов *in vivo* для їх подальшого використання в озелененні населених пунктів, парків, скверів тощо.

Висновки

1. Найефективнішою стерилізацією (понад 90 %) експлантатів рослин *S. matsudana* 'Tortuosa' досягали шляхом їх ізоляції у квітні – червні із застосуванням 1 % AgNO_3 упродовж 10 хв із наступним перенесенням у 2,5 %-й NaClO . Експлантати, отримані шляхом штучної активації меристем у лабораторних умовах у лютому, доцільно витримувати у 0,1 %-му розчині HgCl_2 упродовж 5 хв.

2. Найоптимальніші умови для індукції калюсоутворення в тканинах листових пластинок рослин *S. matsudana* 'Tortuosa' з частотою понад 90 % створено на живильному середовищі МС із додаванням $2,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ 2,4-Д і $0,2 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП, для фрагментів мікропагонів – $2,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ 2,4-Д.

3. Значну кількість мікропагонів рослин *S. matsudana* 'Tortuosa' отримували за допомогою внесення в живильне середовище МС $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП і кінетину.

4. Вагомий результат із мікроклонального розмноження рослин *S. matsudana* 'Tortuosa' одержано на живильному середовищі МС з додаванням $0,25 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ кінетину й $2 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ активованого вугілля, яке дозволяє за 45-добовий цикл культивування одержувати регенеранти.

Список літератури

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений : учеб. пособие / Р. Г. Бутенко – М. : Наука. – 1964. – 272 с.

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

3. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин : теорія і практика : монографія / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. – К. : Наукова думка. – 2005. – 269 с.

4. Машкина О. С. Методические рекомендации по выращиванию посадочного материала сортов тополя сереющего с использованием технологии in vitro / О. С. Машкина, А. И. Сиволапов, Т. М. Табацкая. – Воронеж : Воронежская гос. лесотех. Академия. – 2011. – 30 с.

5. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин : підруч. / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К. : ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с. : іл.

6. Khan I. Modulation of in vitro morphogenesis in nodal segments of *Salix tetrasperma* Roxb. through the use of TDZ, different media types and culture regimes / Khan I., M. Anis // *Agroforestry systems*. – 2012. – Vol. 86. – N. 1. – P. 95–103.

7. Khattab S. Effect of different media and growth regulators on the in vitro shoot proliferation of aspen, hybrid aspen and white poplar male tree and molecular analysis of variants in micropropagated plants / S. Khattab // *Life science journal*. – Vol. 8. – Iss. 1. – 2011. – P. 177–184.

8. Murashige T. A revised medium for rapid, growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // *Physiol. plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – N. 3. – P. 473.

Определены способы получения асептических жизнеспособных эксплантов растений *Salix matsudana* Koidz. 'Tortuosa' Rehd., изолированных из доноров в разные фенофазы и оптимальные условия каллусообразования в тканях эксплантов с частотой более 90 %. Разработана биотехнология микроклонального размножения растений, включающая отбор компонентов питательных сред для различных этапов и типов морфогенеза и позволяющая получать в сжатые сроки значительное количество регенерантов для их дальнейшего применения в озеленении.

Ключевые слова: *salix matsudana* Koidz. 'Tortuosa' Rehd., культура *in vitro*, экспланты, микроклональное размножение, каллус, питательная среда, растения-регенеранты.

The method of producing aseptic viable *Salix matsudana* Koidz. 'Tortuosa' Rehd. explants isolated from donors in different phenophases was developed and The optimal conditions for callus formation in explants tissue with a frequency of more than 90% were studied. The biotechnology of micropropagation, which included the selection of the components of culture media for various stages and types of morphogenesis, was developed and it allowed obtaining a significant number of regenerants in a short time for further use in gardening.

Key words: *salix matsudana* Koidz. 'Tortuosa' Rehd., culture *in vitro*, explants, micropropagation, callus tissue, basal medium, plant-regenerant.

УДК 630*116.64:582.475.4

ЛІСІВНИЧО-МЕЛІОРАТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ У ПРОТИЕРОЗІЙНИХ НАСАДЖЕННЯХ

**В. М. Малюга, С. М. Дударець,
кандидати сільськогосподарських наук**

Наведено основні лісівничо-меліоративні властивості сосни звичайної. Зосереджено увагу на будові та розповсюдженні корневих систем сосни і супутніх деревних рослин у протиерозійних насадженнях, залежно від їх складу та способів підготовки ґрунту. Відображено основні властивості лісової підстилки та інтенсивність її розкладу.

Ключові слова: сосна звичайна, морфологічна характеристика, протиерозійні насадження, лісівничо-меліоративні властивості, лісова підстилка, коренева система, ерозія ґрунту.

© В. М. Малюга, С. М. Дударець, 2015