

УДК 582.772:634.53

ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO РІЗНИХ ВИДІВ ГІРКОКАШТАНА

Т.М. ЧЕЧЕНЄВА,^{1,2} К.Є. ШАВАНОВА,¹ С.П. МАШКОВСЬКА¹

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України
03041 Київ, вул. Героїв Оборони, 15

²Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Досліджено ефективність різних методів стерилізації, вибрано найефективніший із них, визначено умови введення й культивування шести видів гіркокаштана (*Aesculus L.*).

Ключові слова: *Aesculus L.*, культура in vitro, стерилізація, калюс.

Гіркокаштани (*Aesculus L.*) — одна з надзвичайно цікавих груп рослин, дуже популярних у світі завдяки високим декоративним якостям. Вони є джерелом біологічно активних речовин, тому належать до ресурсних рослин. В Україні є види гіркокаштана з Південної Європи, Північної Америки, Східної Азії, Індії, інтродуковані в 1557—1923 рр. [2—4]. Нині стан гіркокаштанових насаджень у містах України, в тім числі й у Києві, катастрофічно погіршився. Це пов'язано як із несприятливою екологічною ситуацією в промислових містах, так і з масовим поширенням хвороб і шкідників, таких як каштанова мінуюча міль (*Cameraria ohridella*) [1]. Внаслідок сумісної дії зазначених чинників велика кількість рослин найпоширенішого в Україні гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum L.*) знаходиться в критичному стані. Інші види і форми гіркокаштанів також не витримують антропогенного тиску, що призводить до їх всихання і загибелі.

Гіркокаштан звичайний — символ міста Києва, він прикрашає його понад 200 років, але близько 50 % дерев уже вичерпали свій адаптивний потенціал [4, 7]. Тому важливо вирішити проблему з посадковим матеріалом, генетично стійким до біотичних і абіотичних чинників урбанізованого середовища, оптимізувати умови вирощування рослин гіркокаштанів за впливу критичних чинників середовища.

Одним із найперспективніших рішень у цій ситуації може бути застосування методів культури in vitro для прискореного мікроклонального розмноження найстійкіших рослин [5—7].

Метою досліджень був добір оптимальних умов стерилізації, культивування і складу поживного середовища для введення в культуру in vitro різних видів гіркокаштана.

Методика

Дослідження проводили на базі Національного університету біоресурсів і природокористування України протягом весняно-літнього сезону 2007 і 2008 років.

Для введення в культуру використовували меристеми листкової пластинки шести видів гіркокаштана ($2n = 40$): гіркокаштани звичайний (*Aesculus hippocastanum* L.), восьмитичинковий (*A. octandra* Marsh.), забутий (*A. neglecta* Lingl.), дрібноквітковий (*A. parviflora* Walt.), голий (*A. glabra* Willd.), червоний (*A. pavia* L.).

Молоді листкові пластинки промивали у розчині мийного засобу для зниження кількості поверхневої мікрофлори, після чого піддавали стерилізації за трьома схемами.

Перша схема передбачала поверхневу стерилізацію послідовним зануренням експлантатів на 15 с у 70° розчин етанолу, промивання дистильованою водою та обробку у 15 %-му розчині комерційного препарату «Білизна» упродовж 15 хв.

Друга схема стерилізації полягала в послідовному використанні 70° розчину етанолу (15 с), промиванні дистильованою водою та обробці мертіюлятом (5 хв).

Третя схема включала стерилізацію з використанням 70° розчину етанолу (15 с), промивання дистильованою водою та занурення у 10 %-й розчин пероксиду водню H_2O_2 (5 хв).

В усіх схемах стерилізації кінцевим етапом було триразове промивання експлантатів стерильною дистильованою водою.

Після добору умов стерилізації для введення експлантатів рослин роду *Aesculus* (молоді листкові пластинки 3–5 см завдовжки по центральній жилці з поперечно перерізними жилками на відстані 1 мм) в культуру in vitro для подальшого культивування застосовували модифіковані агаризовані середовища з макро- і мікросолями за МС [5, 6], додаванням вітамінів і гормонів росту. Індукція первинного калюсу відбувалася в темряві, регенерація рослин — за 16-годинного фотоперіоду, освітленості 2000–2500 лк, температури 22–24 °С.

Досліди виконували у триразовій повторності, кількість експлантатів становила 300 шт. для кожного виду. Отримані результати оброблені статистично.

Результати та обговорення

Деревні рослини, у тім числі й гіркокаштан, характеризуються повільним ростом, містять велику кількість вторинних сполук (феноли, терпени), які в ізолюваних тканинах активуються і можуть інгібувати ріст і поділ клітин, що ослаблює здатність тканин до регенерації. У деревних рослин також спостерігається тенденція до накопичення внутрішньої інфекції, тому важливо підібрати оптимальну схему стерилізації.

Основним показником ефективності стерилізаційної речовини є кількість експлантатів, які нормально розвиваються. У результаті досліджень з використанням 10 %-го розчину H_2O_2 рівень інфекції для різних видів гіркокаштана змінювався в межах 94–100 %. Найменший відсоток інфікованих експлантатів для п'яти видів гіркокаштана отримано в разі використання 15 %-го розчину «Білизна»: застосування мертіюляту (друга схема стерилізації) дало кращі результати лише для рослин *A. pavia* L. (рис. 1).

Після добору схеми стерилізації на модифікованому середовищі МС проводили індукцію калюсу в термостаті за температури 22–24 °С (рис. 2).

Індукцію калюсоутворення спостерігали на 9–10-ту добу культивування. Здатність до калюсоутворення залежно від виду гіркокаштана

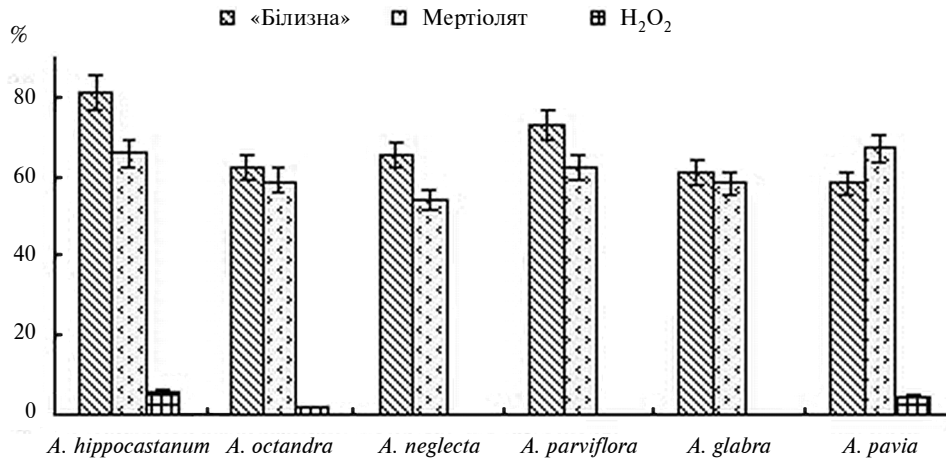


Рис. 1. Вплив стерилізаційного агента на життєздатність експлантатів:
на осі абсцис — різні види гіркокаштана; на осі ординат — частка життєздатних експлантатів, %

змінювалась від максимальної в *A. hippocastanum* L. (71 %) до мінімальної в *A. neglecta* Lingl. (45 %) при обліку наприкінці первинного пасажу (22—24-та доба).

З метою подальшого мікроклонального розмноження видів гіркокаштана у наступному пасажі калуси переносили на світло (16-годинний фотоперіод, освітленість 2000—2500 лк, температура 22—24 °С). Інтенсивне позеленіння ділянок калусу з подальшим пагоновим морфогенезом спостерігали в усіх досліджуваних видів. Найбільшою регенераційною здатністю характеризувався *A. hippocastanum* (рис. 3).

Встановлено, що оптимальною придатною схемою стерилізації листових пластинок рослин роду *Aesculus* L. є послідовна обробка експлан-

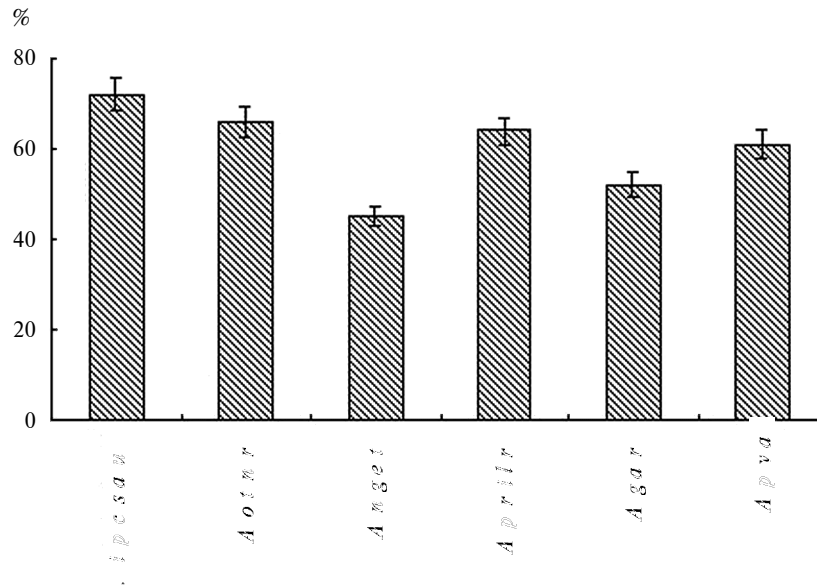


Рис. 2. Здатність різних видів гіркокаштана до калусоутворення:
на осі абсцис — різні види гіркокаштана; на осі ординат — частка експлантатів, що утворили калус, %

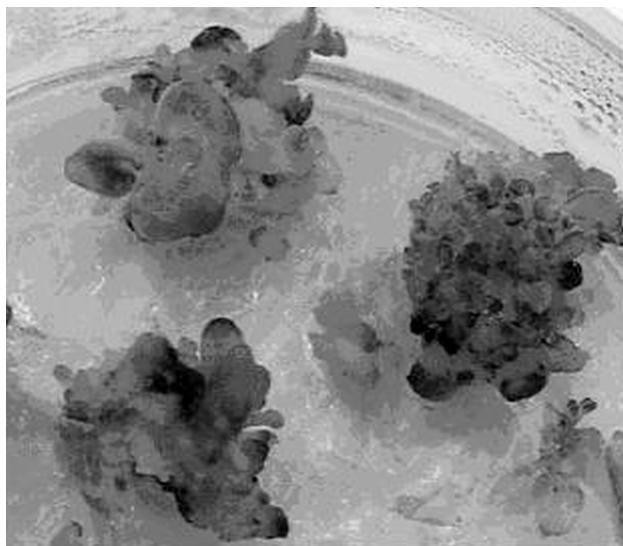


Рис. 3. Пагоновий морфогенез із калюсу *A. hippocastanum*

татів упродовж 15 с у 70° розчині етанолу, промивання дистильованою водою та занурення у 15 %-й розчин комерційного препарату «Білизна» на 15 хв.

Усі шість протестованих видів гіркокаштану можуть бути введені в ізолювану культуру й утворюють тотипотентний калюс із листкової пластинки на модифікованому поживному середовищі МС.

1. Акимов И.А., Зерова М.Д., Гершензон З.С. Первое сообщение о появлении в Украине каштановой минирующей моли *Cameraria ohridella* (Lipoptera, Gracillariidae) на конском каштане обыкновенном *Aesculus hippocastanum* L. (Hippocastanaceae) // Вестн. зоологии. — 2003. — 37, № 1. — С. 3—12.
2. Алентьев П.Н., Троян А.В., Задорожный И.М. Каштан // Садоводство. — 1973. — № 11. — С. 33.
3. Волошин М.П. Конский каштан (*Aesculus* L.) на Украине // Бюл. Главн. бот. сада. — 1961. — Вып. 44. — С. 28—31.
4. Григорюк І.П., Машковська С.П., Яворовський П.П., Колесніченко О.В. Біологія каштанів. — К.: Логос, 2004. — 379 с.
5. Джонс О.П. Размножение хозяйственно важных древесных растений in vitro // Биотехнология сельскохозяйственных растений. — М.: ВО Агропромиздат, 1987. — С. 134—152.
6. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. — К.: Наук. думка, 2005. — 243 с.
7. Шаванова К.Є., Огороднійчук Ю.О., Машковська С.П., Чеченева Т.М. Можливості та перспективи введення в культуру in vitro різних видів каштанів // Матеріали І наук.-практ. конф. «Рослини та урбанізація» (Дніпропетровськ, 21—23 лист., 2007). — Дніпропетровськ, 2007. — С. 234—235.

Отримано 21.05.2009

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO РАЗНЫХ ВИДОВ КОНСКОГО КАШТАНА

Т.Н. Чеченева,^{1,2} Е.Е. Шаванова,¹ С.П. Машковская¹

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев

²Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследована эффективность разных методов стерилизации, выбран самый эффективный из них, определены условия введения и культивирования шести видов конского каштана (*Aesculus* L.).

CULTURE IN VITRO INDUCTION OF DIFFERENT SPECIES *AESCULUS* L.

T.M. Checheneva,^{1,2} K.E. Shavanova,¹ S.P. Mashkovska¹

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

15 Heroyiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine

²Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine

31/17 Vasykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Effectivity of different sterilization methods was researched, among them the most effective was chosen; introduction and cultivation conditions for six species of *Aesculus* L. were determined.

Key words: *Aesculus* L., culture in vitro, sterilization, callus.