

О.М. Цимбал

РОЗМНОЖЕННЯ *SORBUS AUCUPARIA* L. ‘БУРКА’ *IN VITRO*

Sorbus aucuparia L. ‘Бурка’, морфогенез, ризогенез, *ex vitro*

Вступ

Селекційну роботу з представниками роду *Sorbus* L. було започатковано І.В. Мічуріним [3]. Як основний об’єкт досліджень він використовував *Sorbus aucuparia* L., яку схрещував з *Aronia melanocarpa* (Michx) Ellsot., *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. та представниками родів *Pyrus* L., *Malus* Mill., *Crataegus* L. і *Mespilus* L. За допомогою віддаленої гібридизації йому вдалося отримати нові сорти горобини, які до теперішнього часу не втратили свого значення та рекомендовані до господарського та селекційного використання [2, 4].

Завдяки роботі І.В. Мічуріна щодо покращення сортименту представників роду *Sorbus* отримано ряд перспективних сортів цих рослин [7]. До таких сортів належить *S. aucuparia* L. ‘Бурка’ – мічурінський сорт, виведений у 1918 році при схрещуванні *Sorbaronia alpine* Schneid. та *S. aucuparia*. Це дерево заввишки 2,5–3,0 м. Має високу морозостійкість. Листки непарнопірчасті, темно-зелені, слабоопушені [6].

Плоди червонувато-бурі, м’якуш щільний, темнозабарвлений, солодкуватого смаку, дещо терпкий, зі слабко відчутним присмаком горобини. Їх використовують у свіжому та переробленому вигляді. Добре зберігаються 3–4 місяці і більше. При своєчасному зборі урожаю плоди містять сухих речовин 22–28 %, цукрів – 6–10 %, кислот – 0,8–1,4 %, дубильних речовин – 0,46–0,55 %, вітаміну С – 0,026 – 0,04%, каротину – 0,005–0,006 %, вітаміну Р – 0,7–0,8 %, вітаміну В₉ – 0,003 % [2].

Серед сучасних напрямів у біології одним з пріоритетних визнана біотехнологія. Метод клонального мікророзмноження рослин у культурі *in vitro* – один з головних у сучасній біотехнології. Суть його полягає у здатності рослинних тканин утворювати на поживних середовищах під впливом рістрегулюючих речовин калюс, пагони та рослини [1]. Методи біотехнології передбачають використання стандартного обладнання та препаратів, проведення досліджень впродовж року незалежно від кліматичних умов, потребують незначних площ. Крім того, рослинні системи *in vitro* є зручними об’єктами для дослідження процесів клітинної диференціації, морфогенезу (ризогенезу, ембріогенезу), морфології розвитку і регенерації рослин, мікророзмноження цінного матеріалу [5]. Також біотехнологічні методи дають змогу швидко розмножити рослини, збільшити їх коефіцієнт розмноження та отримати масовий, морфологічно вирівняний посадковий матеріал [1, 5].

Мета досліджень

Оскільки перебіг процесів морфогенезу у *S. aucuparia* ‘Бурка’ *in vitro* вивчено недостатньо, метою нашої роботи було опрацювання методик і виконання експериментальних досліджень з мікророзмноження даного представника роду *Sorbus*.

Об’єкт та методи досліджень

При виконанні досліджень користувалися рекомендаціями Р.Г. Бутенко [1] та М.Д. Мельничук [5].

Процес мікророзмноження включає в себе кілька етапів [5], основними з яких є:

- введення експланта в культуру *in vitro*;
- мікророзмноження;
- процес укорінення мікропагонів;
- адаптація рослин-регенерантів до умов *ex vitro*.

© О.М. Цимбал



Рис. 1. Мікроживець *Sorbus aucuparia* 'Бурка' *in vitro*

Для введення у культуру *in vitro* використовували мікроживці завдовжки 2,5 – 4,0 см з однією брунькою, нарізані з маточних рослин, що ростуть на колекційній ділянці у Національному дендропарку «Софіївка» НАН України (рис. 1). Живці нарізали щодаки кожного місяця впродовж вегетаційного періоду.

Результати досліджень та їх обговорення

За результатами досліджень виконаних у 2010–2011 роках визначено оптимальні строки для введення мікроживців *in vitro* (рис. 2).

Перші результати з введення в культуру припадають на третю декаду червня в обох роках досліджень з різницею в 20 %. У 2010 р. у цей період було успішно введено 60 % мікроживців, а в 2011 – 40 %.

Починаючи з першої декади липня, відсоток введення в культуру *in vitro* почав підвищуватись: у 2010 р. він склав 65 %, а у 2011 р. – 75 %. Найвищий показник зафіксовано у другій декаді липня: у 2010 р. – 75 %, а у 2011 р. – 80 %. З третьої декади липня до першої декади вересня спостерігається поступове зменшення ефективності введення в культуру мікроживців з майже повним згасанням наприкінці вересня – початку жовтня.

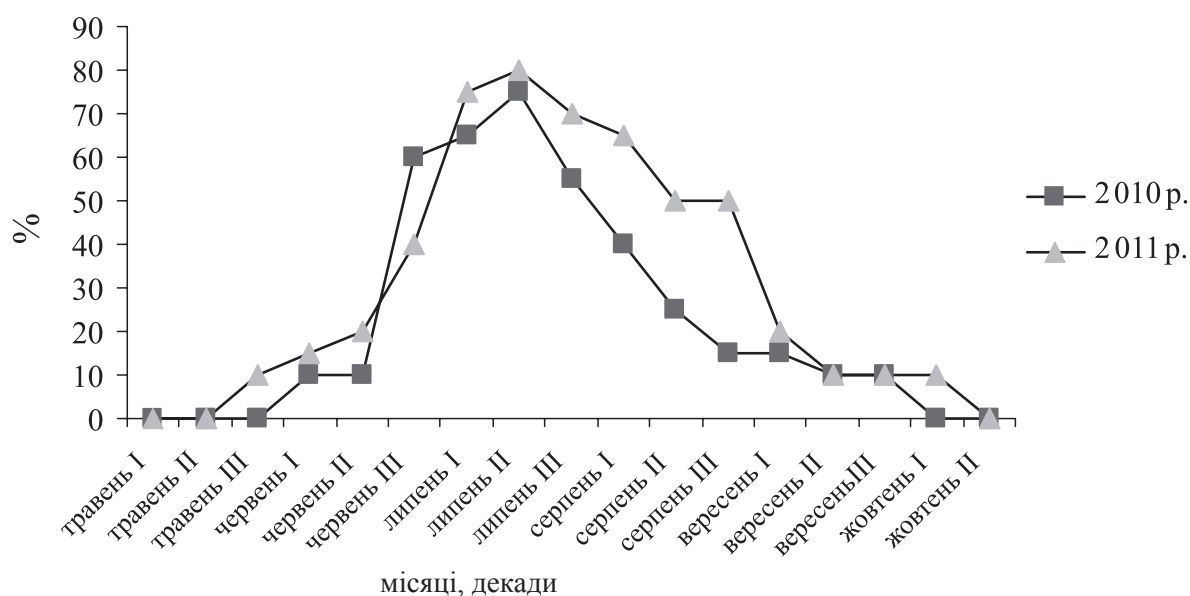


Рис. 2. Ефективність введення мікроживців *Sorbus aucuparia* 'Бурка' у культуру *in vitro* у різні періоди вегетаційного сезону

Можна припустити і пояснити вищенаведені результати тим, що в умовах *in vivo* у місяці, на які припадають найвищі показники введення *in vitro*, рослини *S. aucuparia* 'Бурка' мають високу регенераційну здатність (наприклад, переважну більшість плодкових та декоративних культур розмножують окуліруванням у липні – серпні місяцях).

Ефективність регенерації рослин в умовах *in vitro* значною мірою визначається правильним добором оптимальних способів стерилізації рослинного матеріалу [5]. При виборі стерилізуючої речовини виходили з доцільності використання найбільш доступних, ефективних речовин з урахуванням перспективи масового використання їх на основі біотехнологічних прийомів.

Було випробувано три варіанти стерилізації залежно від експозиції (3, 5 та 7 хв.). Як стерилізуючі реагенти використовували 0,1%-й водний розчин дихлориду ртуті (HgCl_2); 1,0%-й водний розчин нітрату срібла (AgNO_3) та мильний розчин, що слугував контролем (табл. 1).

У варіанті з розчином дихлориду ртуті найбільші відсотки щодо обох показників – ефективності стерилізації та ефективності введення в культуру зафіксовано при експозиції 5 хв. Ефективність стерилізації склала 44,66 %, а ефективність введення в культуру – 35,23 %. Дещо менші показники відмічено при експозиції 7 хв. – ефективність стерилізації склала 25,00 %, а ефективність введення в культуру – 20,35 %. Менш ефективною виявилася експозиція 3 хв., ефективність стерилізації була 17,55 % а ефективність введення в культуру – 18,22 %.

Таблиця 1. Залежність ефективності стерилізації та введення *in vitro* мікроживців *S. aucuparia* ‘Бурка’ від стерилізатора та експозиції

Стерилізатор, концентрація	Експозиція, хв.	Стерильні мікроживці, %	Життєздатні мікроживці, %
Дихлорид ртуті (HgCl_2), 0,1%	3	17,55	18,22
	5	44,66	35,23
	7	25,00	20,35
Нітрат срібла (AgNO_3), 1,0%	3	0	0
	5	20,62	14,37
	7	18,00	13,34
Мильний розчин (контроль)	3	0	0
	5	0	0
	7	0	0

У варіанті з нітратом срібла також найкращі показники спостерігали при експозиції 5 хв. – 20,62 % та 14,37 % відповідно. Нижчі показники при експозиції 7 хв. – 18,00 % та 13,34 % відповідно. При експозиції 3 хв. цей реагент виявився неефективним. У контролі позитивних результатів стерилізації та введення в культуру не отримано.

Для культивування експлантів *S. aucuparia* ‘Бурка’ віддали перевагу живильному середовищу Мурасіге і Скуга (МС), оскільки, за літературними даними [1, 5], воно містить збалансовану кількість макро- та мікроелементів, що сприяє росту ізольованих тканин багатьох видів рослин. У процесі культивування експлантів спостерігали за впливом компонентів живильного середовища на етапи морфогенезу.

Для припинення апікального домінування додавали до живильного середовища речовини цитокінінового типу дії – 6-бензиламінопурин (БАП), що індукує розвиток численних пазушних пагонів. Отримані таким чином пагони відділяли від первинного експланту і знову самостійно культивували на приготованому новому середовищі.

При концентрації 2мг/л цитокініну у середовищі, спостерігали процес найбільшої активації пазушних меристем, що в свою чергу призводить до збільшення кількості пагонів. У варіанті з такою концентрацією БАП кількісна перевага з пагоноутворення була беззаперечна, але мікропагони, що утворилися при культивуванні на даному середовищі, характеризувалися незначними показниками висоти та товщини стебла і для подальшої індукції ризогенезу були непридатні. Тому при подальшому культивуванні отримані пагони пересаджували на середовища, у яких зменшували концентрацію цитокініну від 1,0 до 0,5 мг/л, що спричинювало зменшення коефіцієнту розмноження, але стимулювало апікальний ріст пагонів, які в подальшому використовували для індукції ризогенезу (рис. 3). В усіх інших варіантах середовищ із меншою концентрацією БАП множинне пагоноутворення також спостерігали, хоча і у меншій кількості.

Особливої уваги потребує процес ризогенезу. Укорінення пагонів *S. aucuparia* 'Бурка' *in vitro* залежало від розміру пагона, кількості проведених пасажів та концентрації ауксину у живильному середовищі. Для отримання повністю сформованих рослин-регенерантів зі складу живильного середовища виключали БАП, що гальмує процеси ризогенезу, і додавали ауксини, в основному індолілмасляну кислоту (ІМК), індолілоцтову кислоту (ІОК) та нафтилоцтову кислоту (НОК). Контролем слугувало середовище без ауксинів. З'ясовано, що оптимальні концентрації ауксинів у складі живильного середовища, за яких відбувалися процеси ризогенезу, були наступними: ІМК в межах 0,3–0,5 мг/л, ІОК – 0,1–0,5 мг/л та НОК – 0,9–1 мг/л (рис. 4).



Рис. 3. Пагони *Sorbus aucuparia* 'Бурка', придатні для укорінення



Рис. 4. Укорінені рослини-регенеранти *Sorbus aucuparia* 'Бурка'

За результатами досліджень, сумісне введення у живильне середовище ауксинів ІОК та НОК набагато підвищує показник укорінення пагонів *S. aucuparia* 'Бурка'.

Було відмічено, що при додаванні до живильного середовища ІОК у концентрації 0,1 мг/л, у базальній частині пагонів відбувалося інтенсивне калусоутворення, чого не спостерігалось у варіантах середовищ з іншими ауксинами та їх концентраціями. Ризогенез спостерігався, але слабший і такі рослини-регенеранти виявлялися менш стійкими до нестерильних умов *ex vitro*.

З'ясовано, що найбільший показник ризогенезу спостерігали на середовищі з додаванням ІМК у концентрації 0,5 мг/л – 82,5 % (рис. 5). Дещо меншими були отримані дані на середовищі з ауксином НОК 0,9 мг/л – 62,5 % та на середовищі з поєднанням ІОК 0,5 мг/л та НОК 1,0 мг/л – 67,5 %. Найменш ефективним виявилось середовище з додаванням ІОК з концентрацією 0,1 мг/л – 27,5 %. У варіанті без ауксинів (контроль) ризогенез не спостерігався.

В усіх досліджуваних варіантах живильних середовищ для індукції ризогенезу, коренеутворення спостерігали на 25–30 добу. Кількість коренів коливалася у межах від 1 до 22 шт., а їхня довжина складала від 0,5 до 13 см.

Адаптація до умов *ex vitro* – це досить складний та стресовий етап для рослин-регенерантів після умов *in vitro* як морфологічно, так і фізіологічно [5]. Під час адаптації рослин до нових для них умов гине значна кількість регенерантів, тому актуальним є пошук шляхів, які б сприяли підвищенню кількості нормально адаптованих рослин до нестерильних умов.

У дослідженнях вивчали два варіанти адаптації рослин-регенерантів до умов *ex vitro*:

- в умовах адаптаційної кімнати лабораторії мікроклонального розмноження;
- в умовах полікарбонатної теплиці з установкою штучного туману.

В умовах адаптаційної кімнати коріння рослин відмивали від залишків середовища у слабкому розчині перманганату калію та висаджували у торф'яні таблетки «Jiffi» (рис. 6).

Далі таблетки з рослинами поміщали до скляного боксу з підвищеною вологістю повітря. У подальшому догляд за рослинами складався з періодичного поливу таблеток теплою проточною водою. Коли рослини у таблетках почали збільшувати вегетативну масу, їх пересаджували у горшечки з сумішшю лісової землі, торфу та піску (2:1:1).

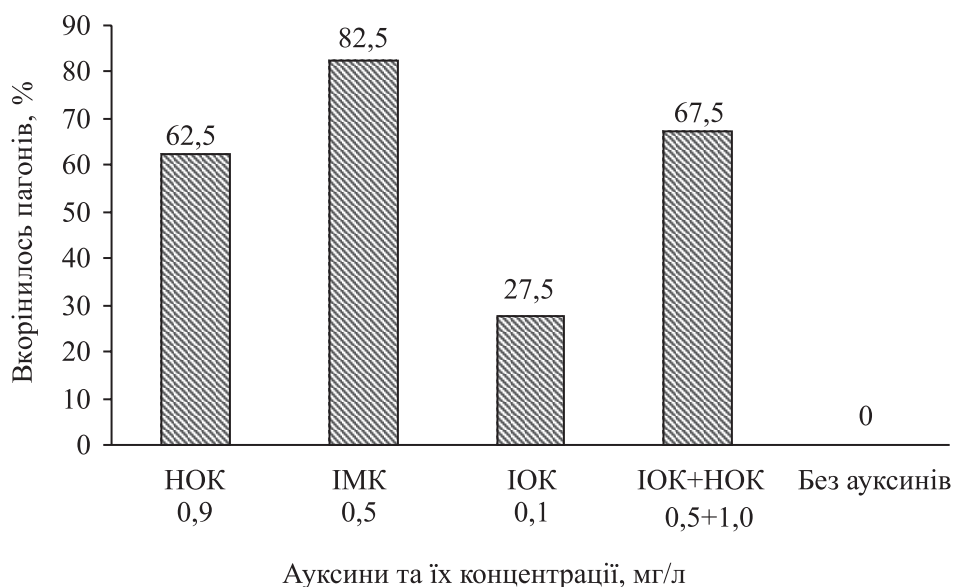


Рис. 5. Укорінення пагонів *Sorbus aucuparia* 'Бурка' *in vitro* залежно від типу ауксину та його концентрації

При адаптації у полікарбонатній теплиці кореневу систему рослин-регенерантів також промивали розчином перманганату калію та висаджували у гряди з субстратом, що складався з річкового піску, торфу та перліту, взятих у рівних частинах. Для підтримки необхідного режиму вологості у середовищі адаптації використовували установку штучного туману, яка автоматично через певний проміжок часу створює переривчасте дрібнодисперсне розпилення води над рослинами-регенерантами. Такі умови запобігають загибелі рослин, оскільки дрібнодисперсне зрошення відбувається часто, в результаті чого повітря насичується вологою. Листки і самі рослини покриваються плівкою води, яка запобігає їх перегріванню, а також відбувається рівномірне зволоження субстрату. Вологість субстрату у теплиці складала 25–65 %, а повітря 85–100 %.

За результатами наших досліджень найвищий показник адаптованих рослин спостерігався в умовах полікарбонатної теплиці з установкою штучного туману – 80 %. Рослини швидко нарощували вегетативну масу і до кінця вегетації висота деяких представників сягала 40 см (рис. 7).



Рис. 6. Рослини-регенеранти *Sorbus aucuparia* 'Бурка' у таблетках «Jiffi» в умовах адаптаційної кімнати



Рис. 7. Рослини-регенеранти *Sorbus aucuparia* 'Бурка' в умовах полікарбонатної теплиці з установкою штучного туману

В умовах адаптаційної кімнати показник адаптації у рослин-регенерантів виявився на 50% менший порівняно з тепличними. Більшість рослин після висадки у торф'яні таблетки «Jiffi» відставали у рості, вегетативну масу нарощували слабо і приріст давали не більше 2,5 см. Більша частина регенерантів загинула.

Висновки

Таким чином, з вищенаведених даних можна зробити наступні висновки: для введення *in vitro* мікроживці *S. aucuparia* 'Бурка' слід нарізати з третьої декади травня та протягом червня місяця; як стерилізатор застосовувати 0,1%-й розчин дихлориду ртуті за експозиції 5 хв.; для мікророзмноження використовувати живильне середовище Мурасіге-Скуга з додаванням 6-БАП у концентрації 2 мг/л; для отримання мікропагонів задовільної довжини продовжувати їх культивування на середовищах із меншою концентрацією 6-БАП – 1,0–0,5 мг/л; для індукції ризогенезу використовувати середовище з додаванням ауксину ІМК у концентрації 0,5 мг/л; адаптацію рослин-регенерантів до нестерильних умов *ex vitro* проводити у теплиці з установкою штучного туману.

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Курьянов М.А. Новые сорта рябины селекции И.В. Мичурина / М.А. Курьянов // Бюл. Центр. ген. лаб. – 1968. – Вып. 15. – С. 12–16.
3. Курьянов М.А. Рябина садовая / М.А. Курьянов. – М.: Агропромиздат, 1986. – 78 с.
4. Меженський В.М. Склад і використання нетрадиційних плодкових культур. Горобина (*Sorbus* L.) та її міжродові гібриди / В.М. Меженський // Генетичні ресурси рослин. – 2005. – № 2. – С. 135–142.
5. Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
6. Поплавская Т.К. Генофонд рябины и перспективы его использования в отдаленной гибридизации / Т.К. Поплавская // Бюллетень научн. информации ЦГЛ им. И.В. Мичурина. – Мичуринск. – 1995. – С. 34–42.
7. Поплавская Т.К. Селекция и внедрение новых сортов рябины в садоводство России / Т.К. Поплавская. – Пермь: Пермское кн. изд-во, 2006. – 152 с.

Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України

Надійшла 04.04.2012

УДК 58.085:581.14

РОЗМНОЖЕННЯ *SORBUS AUCUPARIA* L. 'БУРКА' *IN VITRO*

О.М. Цимбал

Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України

У роботі розглядаються особливості введення експлантів *Sorbus aucuparia* L. 'Бурка' *in vitro*. Запропоновано оптимальну експозицію стерилізації рослинного матеріалу, а також стерилізатор та його концентрацію. Модифіковано живильні середовища для індукції морфогенезу мікропагонів та підібрано умови для адаптації рослин-регенерантів до нестерильних умов *ex vitro*.

UDC 58.085:581.14

REPRODUCTION OF *SORBUS AUCUPARIA* L. 'BURKA' *IN VITRO*

O.M. Tsybmal

National Dendrological Park «Sofiivka» of the National Academy of Sciences of Ukraine

This paper addresses the features of introduction of *Sorbus aucuparia* L. 'Burka' explants *in vitro*. The optimum exposure of plant material sterilization, as well as the sterilizer and its concentration has been proposed. Nutrient media for the microshoots morphogenesis induction have been modified, and conditions of regenerated plants adaptation to the non-sterile conditions *ex vitro* have been defined.