УДК 528.734.4

Г. А. Тарасенко, М. В. Небиков, О. А. Балабак
Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України

ВИКОРИСТАННЯ ДИФЕРЕНЦІЙОВАНИХ МЕТОДІВ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ЕКСПЛАНТІВ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *CORYLUS* L. *IN VITRO*

Наведено результати досліджень щодо можливостей вдосконалення елементів технології мікроклонального розмноження представників роду *Corylus*. Визначено оптимальну стерилізацію, яка виявилась ефективною для всіх досліджуваних видів і сортів представників роду *Corylus* та дала змогу отримати найбільший відсоток стерильних та життєздатних експлантів. Досліджено кращі строки для введення експлантів представників роду *Corylus in vitro*. Визначено, що кращими строками для введення була перша декада травня при якій отримано найвище поєднання стерильних і життєздатних експлантів — 86,6%

Вступ

В Україні тривалий час поширеним способом розмноження горіхоплідних був насіннєвий. Одержаний у такий спосіб садивний матеріал за господарсько-біологічними властивостями відрізняється від материнських рослин (сортів) і є в сукупності різнорідним (гібридний фонд). На сьогоднішній день значної популярності набуло вегетативне розмноження ліщин використовуючи пагони «сильних материнських рослин» відібраних з насаджень. Але якщо ці рослини не мають сертифікату то підвищується ризик розповсюдження хвороб або отримання матеріалу невідомого походження [3].

Інтенсифікація садівництва в Україні, як галузі сільськогосподарського виробництва, пов'язана з проблемою вирощування оздоровленого садивного матеріалу плодових, ягідних і декоративних культур. Дефіцит садивного матеріалу цих рослин обумовлений недостатнім рівнем наукових досліджень з біолого-теоретичних аспектів їх вегетативного розмноження, а також відсутністю координації науково-дослідної роботи щодо теоретичних і прикладних досліджень регенерації, біотехнології і мікроклонального розмноження [4].

Представники роду *Corylus* відіграють важливу роль у виробництві горіхів та декоративному озелененні. У зв'язку з необхідністю інтенсифікації садівництва все більшого значення набуває розробка високоефективних технологій виробництва оздоровленого садивного матеріалу плодових культур. Крім того ліщинові горіхи мають високий попит на ринку як в шкаралупі так і без неї та широко використовуються в кондитерській та косметичній промисловості. На сьогоднішній день плантації представників роду *Corylus* створено на площі не більше 0,7 тис. га., але горіхова промисловість набирає обертів і можливо в майбутньому саме цей вид діяльності сприятиме розвитку вітчизняного експортного потенціалу [2].

Колекційний фонд Національного дендропарку «Софіївка» НАН України складає 33 види, форми та гібриди ліщини, які розташовані в паркових насадженнях і 137 сортів та форм фундуку, що зосереджені в маточних насадженнях та промислових садах на площі близько 11,5 га.

Оскільки, традиційне вегетативне розмноження рослин роду *Corylus* все ще досить складне і не зовсім економічно вигідне та зважаючи на збитки, які завдають вірусні хвороби рослинам, основним напрямом розвитку садівництва в Україні є переведення його на безвірусну основу.

Методики розробленні на модельних об'єктах не завжди вдається застосовувати на інших культурах. Одним з головних обмежуючих факторів розмноження ліщини *in vitro* є високий рівень ендогенної контамінації [5], який робить розвиток в культурі важким і таким, що займає багато часу. Зважаючи на те, що основною умовою успішного введення експлантів у культуру *in vitro* є якісна стерилізація стартового матеріалу, яка полягає у знищенні спор грибів та бактерій на зовнішній поверхні рослинних об'єктів без пошкодження внутрішніх тканин. Вибір стерилізатора, його концентрації та експозиції обумовлюються чутливістю тканини, яку необхідно простерилізувати. Правильно підібраний стерилізатор повинен згубно діяти на всі мікроорганізми і мінімально пошкоджувати тканини. Крім того,

стерилізатор має швидко розкладатись або легко видалятись з тканин промиванням дистильованою водою, для запобігання небажаному отруєнню тканин, яке може негативно вплинути на подальший розвиток експланту [1].

Саме тому нам необхідно було зібрати досвід та додаткову інформацію щодо особливостей застосування загальновживаних стерилізаторів та підібрати експозиції для ефективної стерилізації експлантів представників роду *Corylus* перед введенням їх у культуру *in vitro*.

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводили у 2015–2016 рр. на базі лабораторії мікроклонального розмноження Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України. Об'єктами досліджень були зразки представників роду *Corylus* на території НДП «Софіївка» НАН України.

Введення експлантів представників роду *Corylus in vitro* починали в першій декаді березня.

Зважаючи на те, що 2013 року нами було відібрано відсадки і сіянці 1–3 річних рослин та висаджено їх в контейнери в умовах закритого ґрунту, де вони продовжують рости вже протягом трьох років, відповідно до методики Messeguer та Mele [8] які зафіксували ріст 50% експлантів з дорослих рослин (*Corylus avellana* L.) що протягом двох років вирощувались в умовах закритого ґрунту. Perez et al., [9] зафіксував 70% активного росту *in vitro* латеральних бруньок взятих з вегетаційних пагонів саджанців фундуку вирощених в умовах закритого ґрунту, вже протягом двох років ми відбираємо матеріал для введення *in vitro* з цих рослин паралельно з рослинами, що ростуть в природних умовах.

Крім того, ми пробували ізолювати окремі пагони від впливу зовнішніх чинників та використовували даний матеріал в якості експлантів (рис. 1). Для ізоляції експлантів у ранньовесняний строк у лабораторних умовах пророщували зрізані в осінньо-зимовий період здерев'янілі живці. В інших варіантах введення в культуру відбувалось використовуючи бруньки та однорідні пагони експлантів 1–1,5 см завдовжки (з однією пазушною брунькою кожен) зібрані з обраних маточних рослин у другій декаді березня та першій декаді квітня. Зрізані пагони 10–15 см завдовжки, діагностували на відсутність — наявність вірусної інфекції, стерилізували і нарізали експланти.

Рис. 1. Ізоляція окремих пагонів рослин роду *Corylus* від впливу зовнішніх чинників

Стерилізацію рослинного матеріалу розпочинали з промивання експланта проточною водою. Наступним етапом стерилізації було занурення експланта у водний розчин стерилізатора, після чого виконували трохразове сполоскування в дистильованій стерильній воді. До розчину стерилізатора зазвичай додавали 1–2 краплі Твину-20 для ефективнішої дії стерилізатора.

З метою підвищення ефективності основного стерилізатора застосовували декілька різних видів ступінчастої стерилізації. Дослідження різних варіантів стерилізації наведені в таблиці 1.

Склад живильних середовищ модифікували відповідно до необхідного процесу морфогенезу, змінюючи співвідношення мінеральних солей, вітамінів і доповнюючи регуляторами росту.

Простерилізовані експланти після видалення залишків стерилізатора промивання у дистильованій воді (5 хв.), висаджували на модифіковане живильне середовище DKW [6]. Через 7 діб визначали ефективність стерилізації, тобто відсоток стерильних й інфікованих експлантів у кожному варіанті. Ефективність введення в культуру визначали через 20 діб після висаджування на живильне середовище за кількістю експлантів, у яких спостерігали розвиток макроструктур, від кількості стерильних експлантів.

Режим культивування був наступним: температура — 25–27 °С, фотоперіод 16 годин, відносна вологість повітря 70%, освітлення 2,5–5 тис. люкс.

1. Варіанти стерилізації рослинного матеріалу

Варіант						
1	2	3	4	5	6	7
Антибактеріальний 1,0% розчин Манорм фірма ВІК – А Україна (1 год.)	Антибактеріальний 1,0% розчин Манорм фірма ВІК – А Україна (5 хв.)	Антибактеріальний 1,0% розчин Манорм фірма ВІК – А Україна (1 год.)	Антибактеріальний 1,0% розчин Манорм фірма ВІК – А Україна (5 хв.)	Антибактеріальний 1,0% розчин Манорм фірма ВІК – А Україна (5 хв.)	Антибактеріальний 1,0% розчин Манорм фірма ВІК – А Україна (5 хв.)	Антибактеріальний 1,0% розчин Манорм фірма ВІК – А Україна (5 хв.)
70% розчин етилового спирту на 1-2 с	дихлорид ртуті ($HgCl_2$), 0,1% + Tween 20 (2 хв.)	Гіпохлорит натрію (NaOCl), 5% (3 хв.)	70% розчин етилового спирту на 5 с	0,05% Na Mertiolate ($CgHgHgNaO_2S$ Carlo Erba) на 10 хв., + Tween 20 (Sigma – Aldrich, Stenheim, Germany)	обробка 1,0% нітратом срібла ($AgNO_3$)	стерильна дистильована вода тричі (3 хв. щоразу)
стерильна дистильована вода тричі (3 хв. щоразу)	стерильна дистильована вода тричі (3 хв. щоразу)	стерильна дистильована вода тричі (3 хв. щоразу)	стерильна дистильована вода тричі (3 хв. щоразу)	стерильна дистильована вода тричі (3 хв. щоразу)	стерильна дистильована вода тричі (3 хв. щоразу)	обробка 1,5% водним розчином препарату BTC 885 (Irax Cleangel, Usa)
Гіпохлорит натрію (NaOCl), 15% (5 хв.) + Tween 20			Гіпохлорит натрію (NaOCl), 0,2% (3 хв.)			Реагент PPM в складі жив. серед.
Гіпохлорит натрію (NaOCl), 0,2% (5 хв.) + аскорбінова кислота ($C_6H_8O_6$) 100 мг/100 мл (10 хв.)			стерильна дистильована вода (3 хв.)			
стерильна дистильована вода тричі (3 хв. щоразу						
Обробка препаратом фундазол 1 мг/л (5 хв.)						

1	2	3	4	5	6	7
стерильна дистильована вода тричі (3 хв. щоразу)						

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз кількості стерильних й інфікованих експлантів після застосування випробуваних стерилізаторів показав, що при всіх варіантах найменш ефективним виявився гіпохлорит натрію. Його застосування як основного стерилізатора у варіантах 3–4 забезпечило отримання лише 11–25% стерильних екплантів, 80% експлантів виявились інфікованими. Показники ефективності стерилізації при використанні дихлориду ртуті у варіанті 2 становили 33%, при використанні нітрату срібла у варіанті 6 ми отримали 35% стерильних екплантів, при обробці розчином мертіоляту натрію в 5-му варіанті, 40% були стерильними, використання варіанту 1 стало поштовхом до подальших досліджень. Хоча відсоток стерильних експлантів був також невисоким, всього 45% але нас дуже зацікавила ця методика. Досконало вивчивши роботу Вальтера Гарісона, професора Гуельського університету в Канаді [7], ми дійшли висновку, що можливо необхідно розгрузити даний варіант адже в ньому було забагато діючих речовин, що пригнічувало ріст рослин вже в процесі введення в культуру. Саме тому ми розробили наступний 7 варіант стерилізації залишивши тільки промивання експлантів 1,0% розчином Манорму, дистильованою водою та обробку водним розчином комерційного препарату ВТС 885. Крім того, за методикою Гарісона основним було висаджування експлантів на живильне середовище до вмісту якого входив стерилізуючий реагент PPM (Plant Preservation Mixture). Раніше цей компонент не використовувася в наших дослідженнях. Як результат при використанні варіанту 7 в процесі стерилізації експлантів нам вдалось отримати до 88% стерильних експлантів (рис. 2).

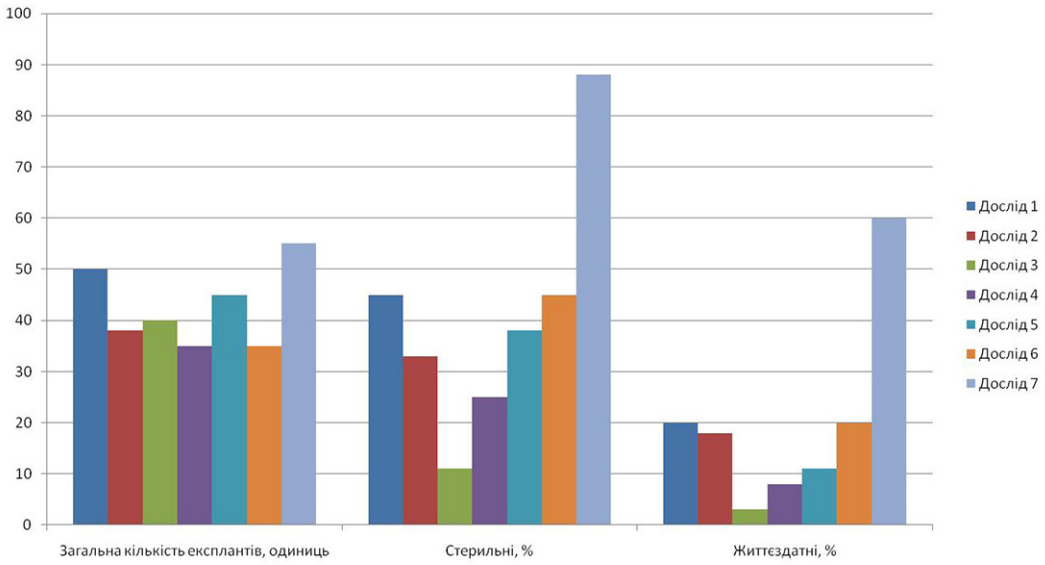

Рис. 2. Порівняльна характеристика стерилізації експлантів представників роду *Corylus*

Порівнюючи строки введення живців в культуру *in vitro* слід зауважити, що живці взяті на початку вегетації були менш заражені. Однак фізіологічний стан був близький до трав'янистих рослин. Тому вихід стерильних, але не життєздатних експлантів був значно більший. При введенні рослинного матеріалу у культуру *in vitro* першого квітня, вихід стерильних-життєздатних експлантів у середньому складав 47,7%. При введенні і аналогічній стерилізації живців в першій декаді травня вихід стерильних експлантів був більшим і в середньому складав — 86,6%. Стерилізація рослинного матеріалу в першій

декаді червня дала змогу отримати вихід стерильних-життєздатних живців — 50,7%. В результаті досліджень встановлено, що при введені в першій декаді квітня більшість живців були стерильними, але не життєздатними (рис. 3).

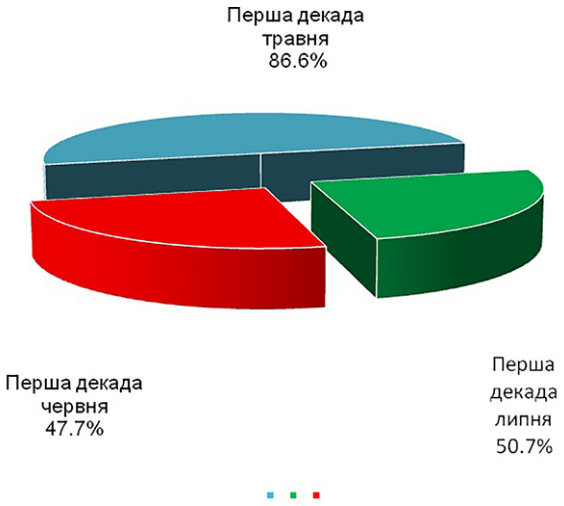

Рис. 3. Вихід стерильних-життєздатних експлантів за однакових умов стерилізації і різних дат введення рослинного матеріалу в культуру in vitro

При однаковій стерилізації рослинного матеріалу в першій декаді червня, більшість живців було інфіковано. Тому кращими строками для введення була перша декада травня при якій отримано найвище поєднання стерильних і життєздатних живців — 86,6% (Рис. 4).

Висновки

В результаті проведених досліджень нами було визначено оптимальну стерилізацію, яка виявилась ефективною для всіх досліджуваних видів і сортів представників роду *Corylus* та дала змогу отримати найбільший відсоток стерильних та життєздатних експлантів.

Визначено, що кращими строками для введення була перша декада травня при якій отримано найвище поєднання стерильних і життєздатних експлантів — 86,6%

Проте основним і найскладнішим залишається підбір компонентів живильного середовища, концентрації та співвідношення регуляторів росту у їх складі, які і визначають напрями розвитку введеного біоматеріалу.

Рис. 4 Стерильні та життєздатні експланти представників роду *Corylus in vitro*

Перелік посилань

1. *Калинин Ф.Л.* Методи культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Сарнацкая, В.В. Полищук В.Е. — К.: Наук. думка, 1980. — 488 с.
2. *Косенко І.С.* Фундук: прикладна генетика, селекція, технологія розмноження і виробництва.: Навч. посібник / Косенко І.С., Опалко А.І., Опалко О.А. / За ред. чл. — кор. НАН України І.С. Косенка. — К.: Наук. думка, 2008. — 256 с.
3. *Наукові* основи та складові галузевої програми розвитку горіхівництва в Україні /За ред. Г.М. Сатіної. — К.: Логос, 2011, 2011. — 100 с.
4. *Тарасенко Г.А.* Використання культури тканин *in vitro* в технологічному процесі для отримання представників роду *Corylus* L. на безвірусній основі /Небиков М.В., Балабак О.А., Бойко А.Л. // Охорона біорізноманіття та історико-культурної спадщини у ботанічних садах та дендропарках: Матер. міжнар. наук. конф., присвяч. 60-річчю Націон. дендрол. парку «Софіївка» як наукової установи НАН України. — Умань: Видавець «Сочінський», 2015. — С. 151–152.
5. *Тарасенко Г.А.* Контамінація рослин роду *Corylus* L. в процесі їх онтогенезу вірусами різних таксономічних груп / Косенко І.С., Небиков М.В., Бойко А.Л. // Роль ботанічних садів та дендропарків у збереженні та збагаченні біологічного різноманіття: Матер. міжнар. наук. конф. — К.: НЦЕБМ НАН України, ПАТ «Віпол», 2013. — С. 270–271.
6. *Driver J. In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock / J. Driver, A. Kuniyuki // HortScience. — 1984. — Vol. 19. — P. 507–509.
7. *Garrison W.* Developing a micropropagation system for the commercialization of a hazelnut industry in Ontario. — режим доступу: http://erieinnovation.com/downloads/garrison.pdf.
8. *Messeguer, J.* and E. Mele. In vitro propagation of adult material and seedlings of *Corylus avellana*. Acta Hort. 212, 1987: P. 499–503.
9. *Perez*, C., A. Rodriguez, A. Revilla, R. Rodriguez, and R.S. Tames. Filbert plantlet formation "*in vitro*" culture. Acta Hort. 212, 1987: P. 505–509.

Г.А. Тарасенко, М.В. Небиков, О.А. Балабак
Национальный дендрологический парк «Софиевка» НАН Украины

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ МЕТОДОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ ЭКСПЛАНТОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *CORYLUS* L. *IN VITRO*.

Приведены результаты исследований возможностей усовершенствования элементов технологии микроклонального размножения представителей рода *Corylus*. Определена оптимальная стерилизация, которая оказалась эффективной для всех исследуемых видов и сортов представителей рода *Corylus* и дала возможность получить наибольший процент стерильных и жизнеспособных эксплантов. Исследованы лучшие сроки введения эксплантов представителей рода *Corylus* in vitro. Определено, что лучшими сроками для введения была первая декада мая, так как именно в этот период получено наивысшее сочетание стерильных и жизнеспособных эксплантов — 86,6%

G.A. Tarasenko, M.V. Nebykov, O.A. Balabak
National dendrological park «Sofiyivka» of NAS of Ukraine

APPLICATION OF DIFFERENTIAL STERILIZATION METHODS OF EXPLANTS OF REPRESANTATIVES OF GENUS *CORYLUS* L. *IN VITRO*.

Investigation results as for the opportunities of improvement the elements of the technology of microclonal propagation of the representatives of genus *Corylus*. The most relevant sterilization which proved to be the most effective for all investigated species and varieties of the representatives of genus *Corylus* and gave the opportunity

to get the greatest percent of abortive and viable explants was determined. The best terms of explants introduction are investigated. It was revealed that the best term of introduction was the first day period of May, as during this period we got the highest combination of sterile and viable explants — 86,6%.

УДК 582.842.7:581.16:635.918

О. Г. Усольцева
Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України

ВЕГЕТАТИВНЕ РОЗМНОЖЕННЯ *PASSIFLORA CAERULEA* L. В УМОВАХ ЗАХИЩЕНОГО ҐРУНТУ

В статті наведено результати досліджень особливостей вегетативного розмноження *Passiflora caerulea* L. (*Passifloraceae* Juss.) в умовах захищеного ґрунту за допомогою стеблових живців. Встановлено оптимальний термін живцювання (II декада квітня). Досліджено наявність та особливості проходження стадій і фаз морфогенезу придаткових коренів при обкоріненні живців.

Ключові слова: *Passiflora caerulea* L., вегетативне розмноження, стеблові живці, термін живцювання, морфогенез придаткових коренів.

Вступ

Тропічні та субтропічні рослини завжди користувалися попитом при внутрішньому озелененні як громадських, так і приватних об'єктів. Особливо це стосується красивоквітучих трав'янистих, деревних, а також ліаноподібних видів, які мають тривалий період цвітіння та є невибагливими до умов вирощування. Останнім часом надається перевага вертикальному озелененню, що дозволяє на обмеженому просторі розміщувати значну кількість різноманітних рослин. Але на сьогодні асортимент ліаноподібних рослин, які використовуються в фітодизайні, дуже обмежений, що пов'язано з недостатньою вивченістю як морфологічних, так і репродуктивних особливостей більшості з цих видів.

Одним з видів ліаноподібних рослин, який відрізняється високими декоративними властивостями, має тривалий термін цвітіння та є невибагливим до умов вирощування є *Passiflora caerulea* L. (*Passifloraceae* Juss.). В дикої природі зустрічається у Бразилії, Аргентині, Парагваї, Уругваї. Це вічнозелена ліана зі здерев'янілими в основі пагонами. Листя темно-зелені, перисті, серцеподібні, глибоко розсічені. В пазухах листків розташовані вусики. Квітки зазвичай білого або кремового кольору, складні, пазушні, до 10 см в діаметрі [3, 7, 9].

В умовах оранжереї Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України (НДП «Софіївка» НАНУ) *Passiflora caerulea* щорічно цвіте (VI–IX), утворює плоди, але вони не мають насіння. Тому метою наших досліджень було дослідити особливості штучного вегетативного розмноження (живцювання) цього виду в умовах захищеного ґрунту та розробити технологічні прийоми прискореного розмноження та дорощування для подальшого використання цього виду в якості як ґрунтової, так і контейнерної культури на окремих ділянках парку.

Матеріали та методи

Дослідження проводили в оранжереї НДП «Софіївка» НАНУ. При живцюванні використовували загальноприйняті методики [2, 5, 8]. Живцювання проводили у весняний і літній періоди з використанням напівздерев'янілих стеблових живців. Біологічну здатність до утворення придаткових коренів визначали за наступними критеріями: обкорінюваністю, тривалістю обкорінення, ступенем розвитку кореневої системи обкорінених живців. Спостереження за утворенням коренів проводили за методикою І. А. Комарова [6]. Морфогенез придаткових коренів вивчали за методикою І. О. Байтулина [1]. Як субстрат для обкорінення стеблових живців використовували пісок.