

РОЗМНОЖЕННЯ *SCHISANDRA CHINENSIS* (TURCZ.) BAILL. *IN VITRO*

Розроблено технологію розмноження *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. в умовах культури *in vitro*. Проаналізовано морфогенну активність тканин і органів в залежності від гормонального складу живильних середовищ. Підбрано оптимальні умови при адаптації рослин.

**Вступ**

Одним з актуальних завдань садівництва є впровадження в широку виробничу практику нових перспективних видів, сортів і форм малопоширених плодкових і ягідних культур [3]. Їхня кількість у Правобережному Лісостепу України обмежена, деякі з них є надбанням лише інтродукційних центрів і рідко використовуються через відсутність даних про біологічні особливості й ефективні методи їх розмноження в умовах культури.

Серед перспективних плодкових культур вагоме місце посідає представник родини лимонникових (*Schisandraceae* Blume.) — лимонник китайський (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.), природний ареал якого — Східно-азійська флористична область [1].

Рослини *S. chinensis* завдяки високим харчовим і лікарським властивостям використовуються як у народній так і в офіційній медицині [2]. Крім цього, лимонник має високі декоративні властивості, тому його висаджують для формування живоплотів, альтанок та декоративного оформлення садів.

Лимонник китайський є малопоширеною плодовою культурою в садівництві України і основними чинниками, що стримують широке його впровадження, є недостатнє вивчення особливостей розмноження саджанців, відсутність науково обґрунтованих рекомендацій з його розмноження та вирощування, а також нестача сортового садивного матеріалу [4]. Для використання у лісівництві, декоративному садівництві, зеленому будівництві цілком придатний садивний матеріал насінневого походження. Проте, збереження генетичної однорідності декоративних садових форм потребує вегетативного розмноження.

Застосовуючи класичні методи розмноження (живцювання, щеплення), одержують відносно обмежену кількість садивного матеріалу. Тому нами було закладено досліди з використанням одного з перспективних методів — розмноження *in vitro*.

Мета роботи — з'ясувати можливості мікроклонального розмноження *S. chinensis*, підібрати оптимальні варіанти стерилізації рослинного матеріалу, живильних середовищ для введення його у культуру *in vitro* з подальшим розмноженням експлантів та отримання морфологічно вирівняного садивного матеріалу.

**Матеріали і методи досліджень**

Дослідження проведено у лабораторії мікроклонального розмноження рослин Національного дендропарку «Софіївка» НАН України.

За первинні експланти використовували пагоони з бічними і апікальними бруньками завдовжки 1–1,5 см взяті з 2-х річних рослин. Відбір живців здійснювали у травні-червні від зовнішньо здорових без фізіологічних відхилень лян *S. chinensis*. Базовим живильним середовищем слугувало середовище за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [9], з повним і зменшеним на половину вмістом макро- та мікроелементів. Додатково до середовища додавали активоване вугілля 2 г/л, сахарозу 30 г/л, агар-агар 7 г/л. рН середовища становила 5,6–5,8.

В експериментах використовували наступні регулятори росту: 6-бензиламінопурин (6-БАП) та  $\beta$ -індолилмасляну кислоту (ІМК).

У роботі використовували методи культури рослинних тканин та індукції морфогенних процесів *in vitro*. Культивування експлантів проводили у культуральній кімнаті з кондиційованим повітрям

на скляних стелажах, при температурі  $25 \pm 1$  °С, відносній вологості повітря 70–75%, фотоперіоді 16 годин і штучному освітленні інтенсивністю 3–5 тис. люкс. Посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища стерилізували згідно загально-вживаних методик [5, 7].

#### Результати досліджень та їх обговорення

Процес мікроклонального розмноження рослин *S. chinensis* нами умовно розділено на декілька послідовних етапів: стерилізація рослинного матеріалу, введення його у культуру *in vitro*, морфогенез, ризогенез та адаптація рослин-регенерантів до умов *in vivo*.

Для забезпечення генетичної стабільності розмножуваних зразків *S. chinensis* за експланти використовували пазушні бруньки та пагони. Підготовку ізольованих верхівок до посадки на живильне середовище починали із ізоляції тканин на інтактних рослинах. Експланти відокремлювали як з верхівок, так і з бічних пагонів завдовжки 1–2 см, бо вони

мають високу регенераційну здатність. Чим більший розмір експланту, тим легше відбуваються процеси морфогенезу, що закінчуються одержанням цілісної пробіркової рослини.

На першому етапі при введенні в культуру *in vitro* для знищення патогенної мікрофлори на поверхні експлантів було випробувано водні розчини різних хімічних реагентів, зокрема 2,5% гіпохлорит натрію (NaOCl), 0,1% дихлорид ртуті (HgCl<sub>2</sub>) та 0,8% нітрат срібла (AgNO<sub>3</sub>) з різними експозиціями. Для більш ефективної дії до кожного із реагентів додавали емульгатор «Твін 80». Після обробки реагентом експланти тричі промивали дистильованою стерильною водою протягом 10–15 хв., після цього висаджували на модифіковане нами живильне середовище МС. Впродовж 7 діб у кожному з варіантів визначали ефективність стерилізації, підраховуючи відсоток стерильних та інфікованих експлантів. Життєздатність та некротичність введених експлантів оцінювали через 25 діб (табл. 1).

#### 1. Ефективність стерилізації експлантів рослин залежно від стерилізаторів та експозиції

Стерилізатор та концентрація	Експозиція, хв.	Ефективність стерилізації експлантів					
		інфіковані		некротичні		життєздатні	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
Гіпохлорит натрію — 3,5%	1,0	18,8	94,0	0	0	1,2	6,0
	1,5	16,8	84,1	0	0	3,2	15,9
	2,0	13,2	66,1	0,5	2,4	6,3	31,5
	2,5	10,1	50,3	1,0	5,2	8,9	44,5
Дихлорид ртуті — 0,1%	1,0	1,2	7,9	0,7	4,5	15,7	83,6
	1,5	0,4	3,1	1,1	5,6	17,5	92,3
	2,0	0,3	2,7	2,1	10,3	16,6	88,0
	2,5	0,1	0,5	7,2	36,0	12,7	63,5
Азотнокисле срібло — 0,8%	1,0	4,7	23,7	4,7	23,4	10,6	52,9
	1,5	3,9	19,7	3,1	15,3	13,0	65,0
	2,0	1,4	7,1	9,1	45,6	9,5	47,3
	2,5	0,8	4,2	12,5	62,3	6,7	33,5

Результати випробування стерилізаторів при різних експозиціях показали, що найбільший вихід життєздатних експлантів (92,3%) одержано при використанні водного розчину 0,1% дихлориду ртуті при експозиції 1,5 хв. (табл. 1). Показники ефективності стерилізації мікроживців *S. chinensis* із застосуванням нітрату срібла були досить високими,

хоча і поступалися варіантам із застосуванням дихлориду ртуті на 30,7%, 27,3%, 40,7% та 30,0% відповідно.

Найменш ефективним стерилізатором виявився гіпохлорит натрію (NaOCl). Його застосування при експозиції 1–2,5 хвилин забезпечило отримання лише 6,0–44,5% життєздатних експлантів.

Після стерилізації експланти переносили для культивування на живильне середовище МС модифіковане різним вмістом регуляторів росту: 6-бензиламінопуріну (БАП),  $\beta$ -індолілмасляної кислоти (ІМК).

Впродовж 15–20 діб від моменту перенесення експлантів на живильні середовища, спостерігали

розростання з різною інтенсивністю базальної частини експлантів та формування впродовж наступних 5–10 діб зачатків адвентивних бруньок.

За результатами вивчення здатності експлантів *S. chinensis* до морфогенезу у різних варіантах живильних середовищ виявлено істотну різницю між варіантами дослідів (табл. 2).

## 2. Залежність пагоноутворення від регуляторів росту та їх концентрацій

Регулятори росту, $\mu\text{M}$		Довжина пагонів, см	Кількість пагонів, шт.	Коефіцієнт розмноження
БАП	ІМК			
2,22	0	1,23 $\pm$ 0,11	1,33 $\pm$ 0,07	0,82 $\pm$ 0,06
	0,25	1,43 $\pm$ 0,17	1,67 $\pm$ 0,08	1,19 $\pm$ 0,14
	0,49	2,60 $\pm$ 0,13	1,80 $\pm$ 0,19	2,34 $\pm$ 0,25
	0,98	2,76 $\pm$ 0,04	1,86 $\pm$ 0,21	2,57 $\pm$ 0,08
4,40	0	1,67 $\pm$ 0,08	5,10 $\pm$ 0,30	4,26 $\pm$ 0,25
	0,25	2,40 $\pm$ 0,12	4,67 $\pm$ 0,23	5,60 $\pm$ 0,28
	0,49	2,83 $\pm$ 0,14	4,78 $\pm$ 0,24	6,76 $\pm$ 0,34
	0,98	3,37 $\pm$ 0,09	4,27 $\pm$ 0,26	7,20 $\pm$ 0,31
8,90	0	3,23 $\pm$ 0,16	4,50 $\pm$ 0,22	7,27 $\pm$ 0,41
	0,25	3,50 $\pm$ 0,17	4,82 $\pm$ 0,24	8,43 $\pm$ 0,42
	0,49	3,65 $\pm$ 0,18	4,85 $\pm$ 0,19	8,85 $\pm$ 0,34
	0,98	3,57 $\pm$ 0,13	4,67 $\pm$ 0,28	8,33 $\pm$ 0,38
13,32	0	1,13 $\pm$ 0,06	4,24 $\pm$ 0,21	2,40 $\pm$ 0,25
	0,25	1,89 $\pm$ 0,11	4,92 $\pm$ 0,25	4,65 $\pm$ 0,27
	0,49	2,23 $\pm$ 0,09	5,72 $\pm$ 0,29	6,38 $\pm$ 0,22
	0,98	2,41 $\pm$ 0,12	5,84 $\pm$ 0,23	7,04 $\pm$ 0,16

Використання середовищ з 2,22  $\mu\text{M}$  БАП сприяло утворенню мінімальної кількості пагонів (1,33–1,86 шт.), середня довжина яких становила 2,0 см.

Додавання до живильного середовища БАП у концентрації 13,32  $\mu\text{M}$  збільшувало коефіцієнт розмноження, але така концентрація негативно впливала на анатомічну структуру експлантів через високий відсоток утворення калюсу на базальній частині пагонів.

Культивування експлантів на середовищах з додаванням БАП — 4,40  $\mu\text{M}$  спричиняло значний розвиток пагонів та додаткових бруньок з коефіцієнтом розмноження у середньому 6.

На живильному середовищі з додаванням 8,9  $\mu\text{M}$  БАП та 0,49  $\mu\text{M}$  ІМК спостерігали максимальний приріст мікропагонів, високу морфогенну здатність,

збільшення кількості міжвузлів, з коефіцієнтом розмноження — 8,85.

Культивування експлантів на даному середовищі на 18–24 добу забезпечило активний ріст як центрального, так і формування додаткових адвентивних пагонів (рис. 1).

Після проведення візуальної оцінки краще розвинуті пагони пасажували на свіже живильне середовище для досягнення ризогенезу. Для цього було проведено підбір різних концентрацій ІМК, яку додавали до середовищ (табл. 3).

З досліджених варіантів найбільш ефективним було використання ІМК у концентрації 2,46  $\mu\text{M}$ . За такого складу живильного середовища початок ризогенезу спостерігали на 10–15 добу. Впродовж 25–30 діб було отримано в середньому 87,7% укорінених рослин, які мали 13,4 шт.

коренів з однієї рослини заввишки у середньому  $85,3 \pm 4,3$  мм (рис. 2). Менш розвинені пагони висаджували на середовище МС з додаванням регуляторів росту, для подальшого мікророзмноження з метою збільшення коефіцієнта розмноження та



Рис. 1. Гемогенез *S. chinensis in vitro*

збільшення кількості садивного матеріалу. Тривалість пасажу в середньому складала 5–6 тижнів і залежала від умов культивування, темпу розмноження, характеру розвитку експланта та можливостей експериментатора.



Рис. 2. Ризогенез *S. chinensis in vitro*

### 3. Характеристика ризогенезу у рослин-регенерантів

ІМК, $\mu\text{M}$	Укорінення, %	Кількість коренів, шт./рослина	Довжина коренів, мм/рослина	Висота рослини, мм
0	—	—	—	—
0,49	12,2	$9,6 \pm 0,5$	$47,6 \pm 2,3$	$70,1 \pm 3,5$
2,46	87,7	$13,4 \pm 0,7$	$82,8 \pm 4,1$	$85,3 \pm 4,3$
4,90	63,5	$12,7 \pm 0,6$	$66,9 \pm 3,3$	$82,5 \pm 4,1$
7,38	40,4	$8,7 \pm 0,4$	$45,3 \pm 1,8$	$68,6 \pm 3,4$
9,80	18,6	$6,8 \pm 0,3$	$40,4 \pm 2,0$	$65,6 \pm 2,6$

Найбільш складним етапом у процесі мікророзмноження є адаптація рослин до природних умов вирощування. На цьому етапі загибель висаджених рослин виду *S. chinensis* іноді досягає 80–100%. Це пов'язано з аномальним розвитком кореневої системи під впливом ауксину, порушеннями водного обміну у рослин-регенерантів, що зумовлено підвищеною транспірацією та зниженою здатністю до фотосинтезу пересаджених з пробірок укорінених рослин [8]. Використання різноманітних субстратів не збільшувало виживання пересаджених з пробірок рослин. Однак при висаджуванні рослин-регенерантів у живильні таблетки Juffy-7, які розміщали в акліматизаційній камері власного виробництва

результати приживання становили 80–95% [6]. За таких умов у пересаджених рослин відбувалися інтенсивний ріст верхівки пагона, здерев'яніння стебла і утворення розгалуженої кореневої системи.

Через 30–50 діб рослини-регенеранти були придатні для пересаджування у відкритий ґрунт (рис. 3). Приживлюваність за такої технології адаптації становила  $92,4 \pm 2,8\%$ .

#### Висновки

Найбільший відсоток стерильних експлантів (92,3%) одержано при поверхневій стерилізації 0,1% водним розчином дихлориду ртуті при експозиції 1,5 хв.



Рис. 3. Адаптовані рослини-регенеранти *S. chinensis*

На етапі гомогенезу *S. chinensis* оптимальним середовищем є МС з додаванням 8,9  $\mu\text{M}$  БАП та 0,49  $\mu\text{M}$  ІМК.

Для досягнення ризогенезу експланти необхідно культивувати на середовищі з додаванням 2,46  $\mu\text{M}$  ІМК.

#### Перелік посилань

1. Аксенов Е. С. Декоративные растения / Е. С. Аксенов, Н. А. Аксенова — М.: АБФ, 2000. — Т. 1. — 560 с.
2. Андрієнко М. В. Малопоширені ягідні і плодові рослини / М. В. Андрієнко, І. С. Роман. — К.: Урожай, 1991. — 167 с.
3. Бублик М. О. Методологічні проблеми сучасного наукового садівництва / М. О. Бублик // Садівництво: міжв. темат. наук. зб. — К.: СЕРЖ, 2005. — Вип. 57. — С. 21–30.
4. Дихтяренко А. В. Размножение зелеными черенками и выращивание саженцев лимонника китайского в Правобережной Лесостепи Украины / А. В. Дихтяренко // Вісник Полтавської державної аграрної академії. — 2008. — № 2. — С. 78–82.
5. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. — К.: Наук. думка, 1980. — 487 с.
6. Косенко І. С. Регенерація рослин у процесі мікроклонального розмноження / І. С. Косенко, А. І. Опалко, М. В. Небиков // Автохтонні та інтродуковані рослини. — 2008. — Вип. 3–4. — С. 57–67.
7. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. А. Кунах. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
8. Небиков М. В. Розмноження *Laburnum anagyroides* Med. у культурі *in vitro* / М. В. Небиков // Автохтонні та інтродуковані рослини. — 2008. — Вип. 3–4. — С. 67–71.
9. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture / Toshio Murashige, Folke K. Skoog // Physiol. Plant. — 1962. — Vol. 15. — P. 473–497.

Рекомендувала до друку Куземко А. А.

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

#### РАЗМНОЖЕНИЕ SCHISANDRA CHINENSIS (TURCZ.) BAILL. IN VITRO

Разработана технология размножения *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. в условиях *in vitro*. Проанализирована зависимость морфогенной активности тканей и органов от гормонального состава питательной среды. Подобраны оптимальные условия для адаптации растений.

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

#### MICROCLONAL PROPAGATION OF SCHISANDRA CHINENSIS (TURCZ.) BAILL.

The propagation methods of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. in the *in vitro* were elaborated. The morphogenic activity of plant tissues and shoots so as its relation from the hormonal composition in the nutrient medium was reviewed. The optimal conditions for the plant adaptation were selected.