

СТЕРИЛІЗАЦІЯ ЕКСПЛАНТІВ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *PYRUS* L. ПЕРЕД ВВЕДЕННЯМ *IN VITRO*

Внаслідок вивчення ефективності застосування трьох традиційних для дослідів з мікроклонального розмноження хімічних речовин-стерилізаторів, а саме гіпохлориту натрію (NaOCl), дихлориду ртуті (HgCl_2) і нітрату срібла (AgNO_3) в оптимальних концентраціях і різних експозиціях з'ясувалось, що найбільший вихід життєздатних експлантів $75,7 \pm 2,8\%$ забезпечило використання дихлориду ртуті у концентрації $0,1\%$ і експозиції 5 хв.

Вступ

Рід *Pyrus* L. (груша) належить до родини *Rosaceae* Juss., підродини *Spiraeoideae* C. Agardh, триби *Pyraceae* Baill. [14, 15, 16]. Груша є однією з найбільш поширених плодових культур в Україні, як у промислових, так і в присадибних та фермерських садах [12]. Дикорослі види груші можуть використовуватись як вихідний матеріал для селекції, а окремі з них та декоративні форми — в озелененні різних об'єктів, завдяки їхній естетичній привабливості.

Представники роду *Pyrus* — багаторічні дерева або кущі, інколи колючі з простими, черговими, майже округлими або овальними листками (2–8 см завдовжки і 1,5–2,0 см завширшки), по краю дрібнопилчастими з загостреною вершиною, на довгих черешках. Квітки білі або блідо-рожеві (до 3 см у діаметрі), зібрані в 2–12 квіткові щиткоподібні суцвіття. Чашечка з п'яти трикутних листочків, пелюсток п'ять, тичинок багато, маточка одна, стовпчиків п'ять, зав'язь нижня. Плід — яблуко, грушо-подібної форми, м'якуш з кам'янистими клітинами. У декоративних видів плоди мінливі за формою, 1,5–4,0 см завдовжки, 1,5–2,0 см завширшки, зелені або жовтуваті [2, 3, 9].

Дикорослі види груші розмножуються насінням. Для збереження сортових ознак плодів та декоративні форми розмножують вегетативно, переважно щепленням [9, 12], однак такий спосіб досить витратний і потребує висококваліфікованої ручної праці [11]. Відомо багато цінних садово-декоративних форм видів роду *Pyrus*, які

переважно розмножують щепленням і живцюванням. Проте, вони мало поширені, що можна пояснити наступним:

- обмеженими термінами заготівлі живців для вкорінення і щеплення;
- відсутністю комплексу технологічних умов для успішного вкорінення і приживання;
- обмеженою кількістю вихідного матеріалу, який необхідно розмножити.

Виходячи з цього, виникає необхідність розробки методики мікроклонального розмноження *Pyrus in vitro*, яка останніми десятиріччями набула поширення в роботі з багатьма культурними рослинами, в тому числі деревними [7].

Мікроклональне розмноження рослин дає змогу в стерильних умовах *in vitro* швидко отримувати велику кількість рослинного матеріалу, генетично ідентичного вихідній рослині, що надзвичайно актуально для дефіцитних генотипів [11]. До основних переваг цього методу розмноження деревних рослин слід віднести: високий коефіцієнт розмноження, можливість культивування протягом усього року, оздоровлення садивного матеріалу, відбір (*in vitro*) рослинного матеріалу з бажаними ознаками [1, 7]. Такий метод розмноження використовується для створення колекцій видів і сортів, необхідних для селекційно-генетичних робіт, збереження зникаючих, рідкісних рослин, інтродукції деревно-декоративних видів рослин у нові умови [4, 6].

Важливим етапом, при розмноженні рослин *in vitro*, є стерилізація рослинного матеріалу, від якості якої залежить успіх подальшого

культивування [4, 11], що зумовлює актуальність виконаних досліджень. При цьому необхідно розв'язати подвійне завдання — з одного боку, дезинфекція рослинного матеріалу повинна бути досить жорсткою, щоб звільнити його поверхню від будь-яких мікроорганізмів, з іншого боку слід мінімізувати небезпеку пошкодження експлантів стерилізатором [1, 8, 10].

Матеріали та методи досліджень

На підставі значення якості стерилізації, як першого і найбільш важливого етапу мікроклонального розмноження, нами було вивчено особливості застосування загальноживаних стерилізаторів і підібрано експозиції для ефективної стерилізації пагонів *Pyrus* перед введенням їх *in vitro* [13]. За первинні експланти використовували частини молодих пагонів з однією брунькою з ювенільних рослин сортів і видів груші: Бере Десятова, Уманська ювілейна, Княгиня Ольга, Софія, *P. salicifolia* Pall, *P. communis* L., що добре проліферують і забезпечують ідентичність спадковості розмноженого матеріалу.

На поверхні рослин, які ростуть у природних умовах, є велика кількість мікроорганізмів, які при введенні *in vitro* потрапляють у живильні середовища, використовують ці живильні речовини для розвитку своїх колоній, пригнічують експлант, внаслідок чого він може загинути. Тому основною умовою успішного введення експлантів *in vitro* є якісна стерилізація вихідного матеріалу, яка полягає у знищенні спор грибів і бактерій на зовнішній поверхні рослинних об'єктів без пошкодження внутрішніх тканин. Підбираючи спосіб стерилізації і стерилізатор, який повинен швидко розкладатися і легко видалятися з тканин промиванням дистильованою водою, слід також зважати на стан живцевого матеріалу [1]. Стерилізація перед введенням *in vitro* належить до надзвичайно відповідальних етапів технології мікроклонального розмноження рослин [5, 11].

Для підвищення ефективності дії основного стерилізатора застосовували ступінчасту стерилізацію [1, 7]. На етапі попередньої стерилізації експланти заздалегідь витримували у мильному розчині, після чого їх промивали під проточною водою, потім 30 секунд — у 70% етанолі і знову промивали дистильованою водою.

За основні стерилізатори використовували водні розчини гіпохлориту натрію (NaOCl) у концентрації 2,5%, дихлориду ртуті (HgCl₂) — 0,1% і нітрату срібла (AgNO₃) — 1,0%, з експозицією — 2,5, 5 та

10 хв. З метою покращення ефективності стерилізуючих реагентів до розчину кожного з них додавали емульгатор «Твін-80».

Простерилізовані експланти після видалення залишків стерилізатора висаджували для активації морфогенезу на модифіковане живильне середовище Мурасіге і Скуга [17] з додаванням 2,0 мг/л 6-бензіламінопуріну, 0,01 мг/л β-індолімасляної кислоти і 30 г/л глюкози. На цьому добу визначали ефективність стерилізації, тобто відсоток стерильних і інфікованих експлантів у кожному варіанті. Ефективність введення в культуру визначали, через 20 діб після висаджування на живильне середовище, як відсоток експлантів, у яких спостерігали розвиток макроструктур від кількості стерильних експлантів.

Експланти вирощували в культуральній кімнаті з кондиціонованим повітрям на скляних стелажах за температури 25±1 °С, відносній вологості повітря 70–75%, 16-годинному фотоперіоді і штучному освітленні інтенсивністю три-п'ять тис. люкс.

Посуд, матеріали, інструменти і живильні середовища стерилізували відповідно до загальноприйнятих методик [1, 10].

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз кількості стерильних та інфікованих експлантів після застосування випробуваних стерилізаторів показав, що при всіх експозиціях найбільш ефективним виявився стерилізатор дихлорид ртуті у концентрації 0,1% (табл. 1).

При його застосуванні найкращим був варіант за експозиції 5 хвилин, у якому вихід стерильних експлантів становив 87,8%, що перевищувало показник варіанту з експозицією 2,5 хвилини на 11,2%, а з експозицією 10 хвилин — на 0,9%. За експозиції 10 хвилин ефективність стерилізації була майже однаковою, як і у варіанті 5 хвилин. Однак, у варіанті з десятихвилинною стерилізацією ефективність введення була меншою.

Менш ефективним за показниками кількості стерильних та інфікованих експлантів було використання гіпохлориту натрію. При його застосуванні у концентрації 2,5% за експозиції 2,5 хв. всі експланти були інфіковані (рис. 1).

Збільшення експозиції до 5 хв. дало змогу отримати 45,7% стерильних експлантів. Найбільш ефективною була стерилізація при застосуванні гіпохлориту натрію за експозиції 10 хв. і становила 47,4%.

1. Ефективність стерилізатора за різних експозицій стерилізації пагонів *Pyrus* перед введенням в культуру *in vitro*

Стерилізатор	Експозиція, хв.	Ефективність стерилізації, %	Ефективність введення, %
Гіпохлорит натрію (NaOCl)	2,5	0	0
	5	45,7±1,8	38,6±1,6
	10	47,4±2,5	24,6±1,4
Дихлорид ртуті (HgCl ₂)	2,5	76,6±3,2	64,3±2,9
	5	87,8±2,6	75,7±2,8
	10	86,9±2,7	71,8±3,1
Нітрат срібла (AgNO ₃)	2,5	62,6±3,0	27,5±1,3
	5	71,0±4,3	32,2±2,1
	10	83,0±3,6	24,9±2,0

Кращими були показники виходу стерильних експлантів при застосуванні нітрату срібла 1,0%. За експозиції 2,5 хв. було отримано 62,6% стерильних експлантів, за 5-хвилинної експозиції цей показник виявився на 8,4% більше, він становив 71,0% стерильних експлантів. Найвищу ефективність стерилізації нітратом срібла було отримано за 10-хвилинної експозиції — 83,0%.

Найвища ефективність введення в культуру пагонів *Pyrus* L., була при використанні стерилізатора

дихлорид ртуті у концентрації 0,1%. У варіанті з 5-хвилинною стерилізацією частка експлантів, у яких спостерігали розвиток макроструктур, становила 75,7%, що приблизно вдвічі перевищує кращі показники, отримані при застосуванні інших стерилізаторів (рис. 2). За експозицій 2,5 та 10 хвилин, цей показник був меншим на 11,4 і 3,9% відповідно.

При застосуванні гіпохлориту натрію у концентрації 2,5% за експозиції 5 хв. кількість експлантів,



Рис. 1. Інфікований експлант при застосуванні гіпохлориту натрію, у концентрації 2,5% за експозиції 2,5 хв.



Рис. 2. Розвиток стерильного експлантата при використанні стерилізатора дихлорид ртуті, у концентрації 0,1% за експозиції 5 хв.

у яких спостерігали розвиток макроструктур становила 38,6 відсотків, збільшення експозиції до 10 хвилин, хоча й дещо підвищило ефективність стерилізації, показник ефективності введення при цьому знизився до 24,6%.

При застосуванні нітрату срібла у концентрації 1,0% за експозиції 2,5 хвилин, показник розвитку макроструктур становив 27,5%. За 5-хвилинної експозиції він був найвищим для цього стерилізатора — 32,2%, а за експозиції 10 хвилин найнижчим — 24,9%.

Висновок

Внаслідок проведених досліджень з'ясовано, що для стерилізації пагонів *Pyrus* перед введенням в культуру *in vitro* найбільш ефективною виявилася стерилізація за такою схемою: мильний розчин; етанол — 30 сек.; дихлорид ртуті у концентрації 0,1% — 5 хвилин, за якої вихід стерильних експлантів становив — 87,8% з ефективністю введення — 75,7%.

Перелік посилань

1. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебн. пос. / Р. Г. Бутенко — М.: ФБК-Пресс, 1999. — 160 с.
2. Груша — *Pyrus L.* / Деревья и кустарники. Покрыто-семенные. Справочник; под ред. Л. И. Рубцова. — К.: Наук. думка, 1974. — С. 240-246.
3. Дрозденко Р. П. Помология. Т. 2. Груша и айва / Р. П. Дрозденко, А. Д. Драч. — К.: Урожай, 1995. — 224 с.
4. Капичникова Н. Г. Яблоня, груша / Н. Г. Капичникова. — М.: Изд. Дом МСП, 2005. — 176 с.
5. Косенко І. С. Перспективи мікроклонального розмноження представників роду *Corylus L.* / І. С. Косенко, А. І. Опалко // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр. Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова; редкол.: Кунах В. А. (голов. ред.) та ін. — К.: Логос, 2007. — Т. 2. — С. 512–516.
6. Косенко І. С. Регенерація рослин у процесі мікроклонального розмноження / І. С. Косенко, А. І. Опалко, М. В. Небиков // Автохтонні та інтродуковані рослини: Зб. наук. праць НДП «Софіївка» НАН України. — 2008. — Вип. 3–4. — С. 57–67.
7. Косенко І. С. Фундук: прикладна генетика, селекція, технологія розмноження і виробництва: [навч. пос. для студ. ВНЗ] / І. С. Косенко, А. І. Опалко, О. А. Опалко; за ред. чл. — кор. НАН України І. С. Косенка. — К.: Наук. думка, 2008. — 256 с.
8. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. А. Кунах. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
9. Матвієнко М. В. Груша в Україні / М. В. Матвієнко, Р. Д. Бабіна, П. В. Кондратенко. — К.: Аграрна думка, 2006. — 320 с.
10. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах // Підручник. — К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. — 520 с.
11. Опалко А. І. Мікроклональне розмноження представників роду *Pyrus L.* в умовах *in vitro* / А. І. Опалко, Н. М. Кучер, М. В. Небиков // Старовинні парки і ботанічні сади — наукові центри збереження біорізноманіття рослин та охорони історико-культурної спадщини: матер. міжнар. наук. конф. присвяченої 215-річчю зо Дня заснування Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України, (5–7 жовтня 2011р.). — Умань: Сочінський, 2011. — С. 261–264.
12. Опалко А. І. Селекція зерняткових культур / А. І. Опалко // Селекція плодкових і овочевих культур: [підруч. для вищ. аграр. закл. освіти] / А. І. Опалко, Ф. О. Заплічко. — К.: Вища шк., 2000. — С. 345–385.
13. Опалко О. А. Вдосконалення методики стерилізації мікроживців *Malus niedzwetzkiiana Dieck* для культури *in vitro* / О. А. Опалко, М. В. Небиков, Л. А. Колдар // Старовинні парки і ботанічні сади — наукові центри збереження біорізноманіття та охорони історико-культурної спадщини: Матер. міжнар. наук. конф., присвяченої 210-річчю «Софіївки» (25–28 вересня 2006 р.). — Умань: Сочінський, 2006. — С. 419–422.
14. Опалко А. І. Мобілізація генетичних ресурсів роду *Pyrus L.* для використання в селекції груші / Опалко А. І., Кучер Н. М., Опалко О. А., Черненко А. Д. // Збірн. наук. праць УНУС. — 2012. — Вип. 80, ч. 1. Агрономія. — С. 136–144.
15. Опалко О. А. Філогенетичні зв'язки культивованих в Україні представників роду *Malus Mill.* / О. А. Опалко, А. Д. Черненко, А. І. Опалко // Інтродукція рослин. — 2012. — № 1. — С. 16–23.
16. Campbell C. S. Phylogeny of subtribe *Pyrinae* (formerly the *Maloideae*, *Rosaceae*): Limited resolution of a complex evolutionary history / Christopher S. Campbell, Rodger C. Evans, D. R. Morgan et al. // Plant systematics and evolution — 2007. — Vol. 266, № 1–2. — P. 119–145.
17. Murashige T. Revised Medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture / Toshio Murashige,

Folke K. Skoog // *Physiol. Plant.* — 1962. — Vol. 15. — P. 473–497.

Рекомендує до друку
Опалко А. І.

СТЕРИЛИЗАЦІЯ ЕКСПЛАНТОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PYRUS* L. ПРИ ВВЕДЕНИИ *IN VITRO*

Н. Н. Кучер
Национальный дендрологический парк «Софиевка» НАН
Украины

Изучена эффективность применения трех традиционных для опытов по микроклональному размножению химических веществ-стерилизаторов — гипохлорита натрия (NaOCl), дихлорида ртути (HgCl_2) и нитрата серебра (AgNO_3), в оптимальных концентрациях и разных экспозициях. Установлено, что

наибольший выход жизнеспособных explantов ($75,7 \pm 2,8\%$) обеспечивает использование дихлорида ртути в концентрации 0,1 % и экспозиции 5 мин.

STERILIZATION OF *PYRUS* L. REPRESENTATIVES' EXPLANTS BEING INTRODUCED *IN VITRO*

N. M. Kucher
The National Dendrological Park "Sofiyivka" NAS of Ukraine

The author researched an application effectiveness of three traditional for microclonal propagation experiments chemosterilants such as sodium hypochloride (NaOCl), mercuric dichloride (HgCl_2) and silver nitrate (AgNO_3) in optimal concentrations and different exposures. It emerged that the application of mercuric dichloride in the concentration 0,1 % and under 5 min exposure provided maximal outcome of viable explants $75,7 \pm 2,8\%$.

УДК 635.977 (571.513)

Н. И. Лиховид, Г. Н. Гордеева

Государственное научное учреждение Научно-исследовательский институт аграрных проблем Хакасии
Россельхозакадемии

КРАСИВОЦВЕТУЩИЕ И КРАСИВОЛИСТВЕННЫЕ ДРЕВЕСНЫЕ РАСТЕНИЯ В ДЕНДРАРИИ ХАКАСИИ

Приведены результаты многолетних исследований декоративных древесных растений. Составлен список деревьев и кустарников по срокам цветения с ранней весны и до осени. Данные растения являются устойчивыми в экстремальных условиях засушливой зоны юга Средней Сибири. Рекомендуемые виды значительно расширяют ассортимент для озеленения населенных пунктов республики.

Вступление

В настоящее время большой интерес для озеленения аридной зоны республики представляют древесные растения, отличающиеся красивым цветением, протекающим в разные сроки. В дендрологической коллекции НИИ аграрных проблем

Хакасии деревья, кустарники и лианы проходят испытание более 60 лет. Часть их входит в ассортимент для озеленения, для некоторых разработаны рекомендации по выращиванию в экстремальных условиях Хакасии (*Philadelphus*, *Forsythia*, *Berberis*, *Crataegus*). Однако, в основном, многие