

1. ЛІСОВЕ ТА САДОВО-ПАРКОВЕ ГОСПОДАРСТВО

УДК 630*161.443.6:582.476

Проф. М.М. Гузь, д-р с.-г. наук;

доц. Р.М. Гречаник, канд. с.-г. наук; доц. М.М. Лісовий, канд. с.-г. наук;

здобувач Ю.Є. Синявський – НЛТУ України, м. Львів

РОЗМНОЖЕННЯ *METASEQUOIA GLYPTOSTROBOIDES* HU & CHENG В УМОВАХ IN VITRO

Проаналізовано літературні джерела щодо тематики проведених досліджень. Наведено найбільш цінні для садово-паркового господарства декоративні форми *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng. Представлено результати досліджень із розмноження *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng методом культури тканин. Встановлено оптимальні терміни заготівлі вихідного матеріалу. Експериментально підібрано: схему стерилізації експлантів; склад живильних середовищ для ініціації, мультиплікації та укорінення *in vitro*; субстрат для адаптації регенерантів до ґрунтових умов. Отримані результати підтвердили доцільність розмноження досліджуваного виду запропонованим способом.

Ключові слова: метасеквоя, клон, *in vitro*, стерилізація, ініціація, мультиплікація, укорінення, адаптація.

Метасеквоя гліптостробопоподібна (розсіченошишкова, китайська або водяна ялиця) (*Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng) вирізняється цінними біолого-екологічними, технологічними, лікарськими і декоративними властивостями та багатством генофонду, зокрема наявністю кількох десятків таксонів виду: 'All Bronze'; 'Chubby'; 'Crackerjack'; 'Emerald Feathers'; 'Fastigiata'; 'Gold Rush'; 'Golden Dawn'; 'Goldrush'; 'Green Mantle'; 'Hamlet's Broom'; 'IFG'; 'Jack Frost'; 'Little Creamy'; 'Little Giant'; 'Matthaei Broom'; 'McCracken's White'; 'Miss Grace'; 'Moerheim'; 'National'; 'Nitschke Cream'; 'Ogon'; 'Prof Ching'; 'Prof Li'; 'Rowena'; 'Royal Air'; 'Rutgers Select'; 'Schirrmann's Nordlicht'; 'Sheridan Spire'; 'Shui San'; 'Spring Cream'; 'Vada'; 'Waasland'; 'White Spot'; var. *caespitosa* Y.H. Long & Y. Wu; var. *Dawn Redwood*; var. *neopangaea*; *Metasequoia cf. glyptostroboides*; *Metasequoia cf. Metasequoia glyptostroboides* тощо [2, 3, 5].

Тому сьогодні актуальним є масове продукування садивного матеріалу *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng для потреб фармацевтичної промисловості, лісового і садово-паркового господарства. Проте розмноження досліджуваного виду насінним способом за межами природного ареалу ускладнюється партеноспермією, а для вегетативного розмноження відсутня достатня кількість вихідного рослинного матеріалу [7-8]. На нашу думку, раціональним вирішенням поставленої задачі є розмноження у штучних контрольованих умовах *in vitro*.

Огляд літератури. Аналіз ретроспективи досліджень з мікророзмноження *in vitro* *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng та її таксонів показав наявність обмеженої кількості експериментальних робіт з цієї проблематики

В Україні окремі аспекти мікроклонального розмноження досліджуваного виду досліджував лише С.І. Слюсар. У своїх працях він зазначає, що як

експланти для розмноження *in vitro* досліджуваного виду доцільно застосовувати ювенільний матеріал сіянців. Первинні експланти деконтамінували в кілька етапів: тричі промивали протічною водою з милом, 15-20 хв – протічною водою, дистильованою водою, 30 сек обробляли 70 %-м водним розчином етанолу і 15 хв – 30 %-м водним розчином гіпохлориду натрію. Найкращий результат індукції органогенезу та намноження відповідно отримано із відібраних на початку вегетаційного періоду бруньок 2-3-річних сіянців на двох модифікаціях живильних середовищ: MS + 0,5 mg/l 6-BA + 0,5 mg/l IAA та MS + 0,3 mg/l 2,4D [4]. Розроблена методика у різних варіантах дала змогу отримати пагони в 17,7-61,2 % та придаткові бруньки – в 10,8-49,0 % експлантів [7-8].

Потрібно зазначити про відсутність вітчизняних джерел інформації щодо отримання *in vitro* укорінених регенерантів та їх адаптації до ґрунтових умов.

Матеріали та методи. Експерименти з розмноження *in vitro* *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng проведено протягом 2009-2013 рр. у лабораторії культури тканин кафедри лісових культур і лісової селекції НЛТУ України за загальноприйнятими в біотехнології методиками в шість етапів: вибір рослини-донора та заготівля експлантів, стерилізація вихідного рослинного матеріалу, ініціація і намноження експлантів, укорінення та адаптація отриманих рослин-регенерантів до ґрунтових умов [6, 9].

Джерелом експлантів слугували вирощені із насіння в умовах відкритого ґрунту на території декоративного розсадника Державного ботанічного саду НЛТУ України 5-6 річні рослини *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng. Як експланти використали розібрані вегетативні бруньки із заготовлених у лютому-березні живців. Для деконтамінації первинних експлантів використано стерилізуючі агенти: протічну H₂O з детергентом; 50, 70, 96 %-ві водні розчини C₂H₅OH; 30, 50, 70 %-ві водні розчини NaClO; 0,1; 0,2; 0,3 %-ві водні розчини AgNO₃ з різною експозицією. Після оброблення кожним агентом експлантати тричі по 5 хв промивали стерильною дистильованою H₂O.

Експланти культивували на модифікованих твердих живильних середовищах Murashige and Skoog (MS) та Litvay (LM) за таких умов [1, 4]: температура повітря 20-22 °C, відносна вологість повітря 30-35 % та 16-годинний фотоперіод (3 кЛК). Регенеранти адаптували в дерновому ґрунті з піском (1:1) і в дерновому ґрунті з піском та торфом (1:1:1). У кожному варіанті досліді використано по 50 експлантів.

Результати досліджень та обговорення. Деконтамінацію первинних експлантів проводили за послідовністю, наведеною в табл. 1. Отримані результати свідчать, що найбільш ефективними є варіанти досліді № 4 та 5 – отримали 78 та 80 % асептичних експлантів відповідно. Високий відсоток заражених експлантів отримано у варіантах № 1 та 2, що спричинено відсутністю першочергового обробітку рослинного матеріалу розчином етанолу і наступною його контамінацією під час виділення меристем. У варіантах досліді № 3 та 6 спостерігалась значна кількість некротичних (почорнілих) експлантів – 77 та 86 % відповідно, що доводить недоцільність застосування високих концентрацій C₂H₅OH і AgNO₃ при стерилізації вже розібраних експлантів та тривалих експозицій оброблення бруньок етанолом.

Табл. 1. Показники деконтамінації вихідних експлантів *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng

Варіант дослід	Застосований реагент (в послідовності використання →)									Отримано експланти, %		
	C ₂ H ₅ OH*		H ₂ O + де-тергент	NaClO		C ₂ H ₅ OH		AgNO ₃				
	концен-трація, %	експози-ція, сек.	експози-ція, год.	концен-трація, %	експози-ція, хв.	концен-трація, %	експози-ція, сек.	концен-трація, %	експози-ція, хв.	контамі-новані	асептичні	некротич-ні
1	-	-	4	30	5	50	10	0,1	5	82	18	-
2	-	-	16	50	5	70	10	0,2	5	86	6	8
3	-	-	24	70	5	96	10	0,3	5	22	2	77
4	96	10	4	30	10	-	-	0,1	10	20	78	2
5	96	15	16	50	10	-	-	0,2	10	-	80	20
6	96	30	24	70	10	-	-	0,3	10	-	14	86

* застосовували до початку виділення меристем (розбирання бруньок).

Ініціацію отриманих асептичних експлантів отримали на твердих живильних середовищах MS і LM, модифікованих різним співвідношенням та концентрацією ауксинів (NAA; 2,4-D) та цитокініну (6-BA) (табл. 2).

Табл. 2. Показники ініціації експлантів *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng

Варіант дослід	Живильне середовище	Доповнення			Ініційованих експлантів, %	
		NAA, mg/l	2,4-D, mg/l	6-BA, mg/l	через 20 діб	через 40 діб
1	MS	0,5	0,3	-	54	22
2		0,5	0,3	0,5	88	78
3		-	0,3	0,5	74	66
4		0,5	-	0,5	90	74
5		0,5	-	-	32	14
6		-	-	0,5	20	8
7	LM	0,5	0,3	-	24	10
8		0,5	0,3	0,5	66	52
9		-	0,3	0,5	60	42
10		0,5	-	0,5	78	58
11		0,5	-	-	32	4
12		-	-	0,5	-	-

Дані табл. 2 свідчать, що кращі показники ініціації експлантів отримано у варіанті дослід № 2 і 4-78 та 74 % відповідно (рис. 1, 2). Помітно гірше розвивались експланти на живильному середовищі LM у всіх без винятку його модифікаціях. У варіантах дослідів № 6 та 12 на середовищах без ауксинів отримано найгірші результати – відповідно 8 та 0 % ініційованих експлантів. Після 20-ї доби фази ініціації спостерігалось пригнічення росту клонів на середовищах без цитокініну.

Намноження (мультиплікацію) отриманих ініційованих експлантів отримали на твердих живильних середовищах MS і LM, доповнених різним співвідношенням та концентрацією NAA; 2,4-D та 6-BA (табл. 3).

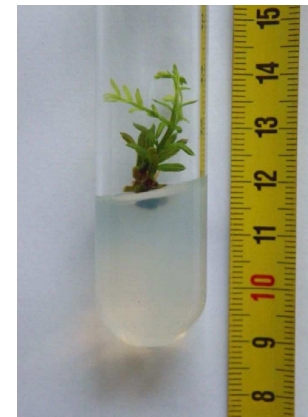


Рис. 1. Ініціація органогенезу *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng (20 доба) in vitro



Рис. 2. Ініціація органогенезу *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng (40 доба) in vitro

Табл. 3. Показники намноження експлантів *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng

Варіант дослід	Живильне середовище	Доповнення			Показники намноження експлантів		
		NAA, mg/l	2,4-D, mg/l	6-BA, mg/l	R, %	SH, шт.	SE, шт.
1	MS	0,5	0,5	0,1	12	2,2	-
2		0,5	0,5	0,5	18	2,3	-
3		0,5	0,5	1,0	28	3,0	1,4
4		0,5	0,5	2,0	12	1,9	-
5		0,5	-	0,5	18	1,3	-
6		-	0,5	1,0	32	3,6	0,9
7	LM	0,5	0,5	0,1	54	3,3	0,9
8		0,5	0,5	0,5	42	5,8	1,3
9		0,5	0,5	1,0	96	6,9	3,0
10		0,5	0,5	2,0	68	7,4	2,4
11		0,5	-	0,5	56	6,9	1,2
12		-	0,5	1,0	92	7,2	2,5

Примітка: R – частка експлантів, які утворили адвентивні мікропагоні; SH – кількість нових мікропагонів на експлант; SE – кількість нових сегментів на мікропагоні.

Найвищу частку експлантів, які утворили адвентивні мікропагоні; найбільшу кількість нових мікропагонів на експлант і нових сегментів на мікропагоні отримали у варіанті дослід № 9-96 %; 6,9 шт.; 3,0 шт. відповідно і у варіанті дослід № 12-92 %; 7,2 шт.; 2,5 шт. відповідно (рис. 3). Варто зазначити, що на середовищі LM спостерігали поодинокі випадки ризогенезу намножених експлантів.

Укорінення розділених після фази намноження експлантів здійснювали протягом 20-30 діб на живильних середовищах MS та LM із зменшеною у двічі кількістю мінеральних солей і доповнених виключно ауксинами (табл. 4).

Табл. 4. Показники ризогенезу експлантів *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng

Варіант досліджу	Живильне середовище	Доповнення		Укорінилось експлантів, %	
		NAA, mg/l	2,4-D, mg/l	через 20 діб	через 30 діб
1	0,5 MS	0,5	-	12	22
2	0,5 MS	0,25	0,25	28	36
3	0,5 MS	-	0,5	26	50
4	0,5 MS	0,25	-	12	18
5	0,5 MS	0,1	0,1	18	44
6	0,5 MS	-	0,25	24	42
7	0,5 LM	0,5	-	18	28
8	0,5 LM	0,25	0,25	48	56
9	0,5 LM	-	0,5	48	70
10	0,5 LM	0,25	-	22	24
11	0,5 LM	0,1	0,1	28	32
12	0,5 LM	-	0,25	64	82

Дані табл. 4 свідчать, що найкраще укорінення спостерігали у варіанті досліджу № 9 (70 %) на середовищі 0,5 LM, доповненому 0,5 mg/l 2,4-D, та у варіанті № 12 (82 %) на середовищі 0,5 LM, доповненому 0,25 mg/l 2,4-D (рис. 4, 5). Найгірше коренеутворення спостерігалось у експлантів, які культивувались на живильному середовищі 0,5 MS або без доповнення середовища 2,4-D.

Остаточний результат мікроклонального розмноження залежить від успішності проведення адаптації отриманих клонів до ґрунтових умов. Укорінені експланти, за допомогою пінцета, виймали з пробірок та дистильованою водою змивали залишки агару, що запобігає загинанню коріння та садили у завчасно приготовлений простерилізований субстрат. Укорінені рослини-регенеранти пересаджували у два типи ґрунтового субстрату з нейтральною або слабнокислою реакцією: дерновий ґрунт з піском (1:1) та дерновий ґрунт з піском та торфом (1:1:1). Адаптацію проводили в умовах культуральної кімнати (рис. 6). Внаслідок на 60 добу культивування отримали 48 та 82 % живих рослин відповідно.



Рис. 3. Намноження *in vitro* *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng



Рис. 4. Ризогенез *in vitro* *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng



Рис. 5. Вкорінений регенерант *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng



Рис. 6. Адаптація регенеранта *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng у субстраті

Висновки. Проведені експерименти з культури тканин *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng засвідчили ефективність розмноження *in vitro* досліджуваного виду. При цьому оптимальною є така схема клонування.

1. Деконтамінацію вихідних експлантів доцільно проводити в такій послідовності: 96 %-м водним розчином етанолу протягом 15 сек; проточною H_2O з детергентом – 16 год; 50 %-м водним розчином $NaClO$ – 10 хв; 0,2 %-м водним розчином $AgNO_3$ 10 хв; із триразовим промиванням виділених меристем дистильованою водою після кожного реактиву. Отримано 80 % асептичних експлантів.
2. Використання для ініціації досліджуваних експлантів живильного середовища MS, доповненого 0,5 mg/l NAA + 0,3 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l 6-BA забезпечує отримання найбільшої кількості ініційованих експлантів (78 % після 40 діб культивування).
3. Для намноження ініційованих експлантів доцільно використовувати тверде живильне середовище LM, доповнене 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l 6-BA. Використання цього середовища забезпечує отримання не менше 96 % експлантів з адвентивними мікропагонами; 6,9 нових мікропагонів на експлант і 3,0 нових сегментів на мікропагін.
4. Для укорінення мікроживців досліджуваного виду найбільш придатним живильним середовищем є 0,5 LM, доповнене 0,25 mg/l 2,4-D.
5. Адаптацію регенерантів до ґрунтових умов доцільно проводити в умовах культуральної кімнати в дерновому ґрунті з піском та торфом (1:1:1), що забезпечує після 60 діб культивування отримання 82 % адаптованих рослин.

Література

1. Litvay J.D. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.) / John D. Litvay, Devi

C. Verma, Morris A. Johnson // Plant cell reports. – Springer Verlag. – 1985. – Vol. 4, Issue 6. – Pp. 325-328.

2. Metasequoia (Genus) – ZipcodeZoo. [Electronic resource]. – Mode of access http://zipcodezoo.com/Key/Plantae/Metasequoia_Genus.asp.

3. Metasequoia glyptostroboides plant named 'Shirrmann's nordlicht': Plant Patent US PP20,820 P2 United States, PLT/213 A01H7/00/Kools Cornelius. – US 12/316,958; Filed: Dec. 18, 2008; Date of Patent: Mar. 9, 2010, US. Patent. – 6 p.

4. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Pl. – Copenhagen. – 1962. – № 15. – Pp. 493-497.

5. Nogue C. Cultivars of Metasequoia glyptostroboides / C. Nogue // The Geobiology and Ecology of Metasequoia. Series: Topics in Geobiology. Netherlands: Springer. – 2005. – Vol. 22. – Pp. 361-366.

6. Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин : підручник [для студ. ВНЗ] / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К. : Вид-во "Поліграф-Консалтинг", 2003. – 520 с.

7. Слюсар С.І. Біологічні особливості видів родини Taxodiaceae F.W. Neger у зв'язку з інтродукцією в Лісостепу України : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.05 – "Ботаніка" / Станіслав Ігорович Слюсар; НАН України. Нац. ботан. сад ім. М.М. Гришка. – К., 2005. – 18 с.

8. Слюсар С.І. Інтродукція таксодієвих (Taxodiaceae F.W. Neger) в Лісостепу України / С.І. Слюсар, С.І. Кузнецов / за ред. проф. М.А. Кохна. – К. : Вид. центр НАУ, 2008. – 154 с.

9. Пат. 90219 Україна, МПК A01H 4/00. Спосіб розмноження in vitro Metasequoia glyptostroboides Hu & Cheng / М.М. Гузь, Р.М. Гречаник, М.М. Лісовий, Ю.Е. Синавський; заявник і власник пат. НЛТУ України. – Заявл. 30.01.2014, опубл. 12.05.2014, Бюл. № 9. – 4 с.

Гузь Н.М., Гречаник Р.М., Лісовий Н.Н., Синавський Ю.Е. Размножение Metasequoia glyptostroboides Hu & Cheng в условиях in vitro

Проанализированы литературные источники по тематике проведенных исследований. Приведен перечень наиболее ценных для садово-паркового хозяйства декоративных форм *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng. Представлены результаты исследований по размножению *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng методом культуры тканей. Установлены оптимальные сроки заготовки исходного материала. Экспериментально подобраны: схема стерилизации эксплантов; состав питательной среды для инициации, мультипликации и укоренения in vitro; субстрат для адаптации регенерантов к почвенным условиям. Полученные результаты подтвердили целесообразность размножения исследуемого вида предложенным способом.

Ключевые слова: метасеквойя, клон, in vitro, стерилизация, инициация, мультипликация, укоренение, адаптация.

Guz M.M., Grechanyk R.M., Lisoviy M.M., Sinjavskiy Y.E. The Reproduction of Metasequoia Glyptostroboides Hu & Cheng under In Vitro Conditions

The analysis of the literature on the research subject is done. A brief description of the most valuable for Landscape Architecture decorative forms of *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng is provided. Some results of the investigation of *Metasequoia glyptostroboides* Hu & Cheng reproduction by using tissue culture are presented. Optimum conditions of procurement of starting material are determined. As the result of the experiments conducted the following issues are selected: a diagram of explants sterilization; composition of culture media for initiation, multiplication and rooting in vitro; substrate for regenerates' adaptation to ground waters. Obtained results confirmed expediency of reproduction of investigated species using recommended method.

Keywords: Metasequoia, clone, in vitro, sterilization, initiation, multiplication, rooting, adaptation.

УДК 639.1.06

Проф. П.Б. Хоцький, д-р с.-г. наук;
ст. наук. співроб. І.М. Скольський, канд. с.-г. наук;
здобувач О.М. Похалюк – НЛТУ України, м. Львів

ПЕРСПЕКТИВИ ВЕДЕННЯ МИСЛИВСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА В УГІДДЯХ ТЗОВ "ЯВІР ПЛЮС"

Товариство з обмеженою відповідальністю "Явір плюс" створене у 1995 р. Одним із перспективних напрямів його господарської діяльності є вольєрне розведення мисливських звірів. Товариством в угіддях Державного підприємства "Ківерцівське лісове господарство" влаштовано вольєр площею понад 200 га. Основними об'єктами ведення вольєрного мисливського господарства є *Sus scrofa*, *Cervus elaphus*. У 2011 р. із Австрії у вольєр завезено 16 *Cervus elaphus*, із фермерського господарства Волинської області – 10 *Sus scrofa*. Налагоджено підгодовлю ратичних, їх охорону. У структурі товариства організовано науковий підрозділ для вирішення організаційних, біотехнічних, експлуатаційних та інших питань.

Ключові слова: *Sus scrofa*, *Cervus elaphus*, вольєр, Волинська область, підгодовля.

Рациональное ведение мисливського господарства займає помітне місце в системі соціальних цінностей європейських країн. Полювання, рибальство – важливі складові економіки багатьох із них (Австрія, Угорщина, Німеччина), а дохід від мисливства не менший, ніж надходження від деяких розвинених галузей промисловості. Що ж до Західного регіону України, то мисливське господарство ведеться тут загалом неефективно і є нерентабельним. Це зумовлює необхідність пошуку нових форм і методів ведення мисливського господарства, розробки концептуально-засадничих принципів мисливсько-господарської діяльності на регіональній основі [6]. Одним із перспективних напрямів мисливсько-господарського виробництва є вольєрне розведення мисливських звірів. Воно має багатовікову історію. Так, у 1900 р. в Галичині функціонувало 4 вольєри (загальною площею 1404 га), через 10 років їх кількість зросла до 15. В Австро-Угорській імперії найбільше вольєрів було організовано на території сучасної Чехії – 90 (площа 84,8 тис. га). Серед інших країн імперії Чехія характеризувалася найефективнішим веденням мисливського господарства [7]. Сучасна чисельність вольєрних і фермерських господарств у Чехії є меншою (понад 70). У них утримується близько 10 тис. ратичних тварин.

Загалом, з початку ХХІ ст. у багатьох країнах світу активно розвивається вольєрне мисливське господарство з метою отримання м'ясної і пантової продукції, полювання на звірів в обгороджених територіях, випуск звірів "під постріл", створення нових стад та ін. Розведення дичини на обгороджених територіях добре організоване. Зокрема у вольєрах Канади утримуються 160 тис. ратичних, більше в США – 200 тис., в Австралії – понад 220 тис. ратичних. У Європі створено приблизно 10 тис. мисливських ферм, в яких утримується більше 700 тис. оленів і диких свиней [1]. М'ясо диких звірів надходить у продаж. Так, в Іспанії щорічно добувають 70 тис. оленів, при загальній чисельності поголів'я понад 650 тис. особин. Від продажу оленини отримують 30-40 млн євро доходу [3]. У країні зареєстровано 150 ферм, в яких утримується приблизно 5 тис. голів. Більшість господарств вирощують оленів заради м'ясної продукції. Цей напрям розведення дичини простіший в організації, гарантує прибуток, оскільки попит на оленину, яка не містить холестерину, швидко зростає і, відпо-