

Л.А. КОЛДАР, М.В. НЕБИКОВ

Національний дендрологічний парк "Софіївка" НАН України
Україна, 20300 м. Умань, вул. Київська, 12а

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН CERCIS SILIQUASTRUM L.

Наведено результати мікроклонального розмноження рослин Cercis siliquastrum L. в умовах культури in vitro, стерилізації рослинного матеріалу, підбору та модифікації живильних середовищ з метою одержання рослин-регенерантів, придатних для використання в умовах in vivo.

Серед великого різноманіття рослин провідне місце посідають деревні рослини. Представником цієї групи є рід *Cercis* L. (родина *Caesalpiniaceae* R. Rr.), який походить з прадавньої флори Землі і є джерелом цінного високодекоративного матеріалу. Рослини роду мають лікарські властивості, їх широко використовують у фармакологічній промисловості Китаю і з цією метою вирощують у розсадниках [4]. Однак, незважаючи на популярність церцисів у багатьох країнах світу, в Україні їх майже не вирощують, за винятком ботанічних садів та дендропарків, у колекціях яких представлені лише одиничні екземпляри кількох видів цього роду. На нашу думку, це зумовлено відсутністю даних щодо видового та формового складу роду *Cercis*, необізнаністю фахівців з їх біоекологічними особливостями та відсутністю ефективних методів розмноження.

Серед рослин, інтродукованих на Україні, церцис європейський (*Cercis siliquastrum* L.) є маловідомим. Для нього характерне тривале та рясне цвітіння, яскраво забарвлені квітки. Завдяки високій загальній декоративності церцис заслуговує на ширше впровадження у зелене будівництво України. Основною передумовою успішного використання рослин в озелененні є розробка методів їх масового розмноження і вирощування садивного матеріалу.

Одним із перспективних методів є розмноження рослин у культурі *in vitro* — вирощування рослинного матеріалу (клітин, тканин, органів тощо) на штучних живильних середовищах в асептичних умовах. Суть його полягає у збільшенні коефіцієнта розмноження, оздоровленні та одержанні морфологічно вирівняного матеріалу, а також можливості добору рослинного матеріалу з потрібними ознаками [5].

Упродовж останніх десятиліть розроблено ефективні методи розмноження багатьох видів і форм рослин *in vitro* [2]. Оскільки види *Cercis* мають низьку коренеутворюючу здатність, а інформація щодо розмноження *C. siliquastrum* у культурі *in vitro* відсутня, то розробка методу мікроклонального розмноження цього виду є актуальною.

Мета роботи — дослідити можливість мікроклонального розмноження *C. siliquastrum*; підібрати оптимальні варіанти стерилізації рослинного матеріалу та живильних середовищ; збільшити коефіцієнт розмноження рослин та отримати морфологічно вирівняний матеріал для потреб зеленого будівництва.

Матеріал, методи та умови досліджень

У роботі використано методи культури рослинних тканин та індукції морфогенних процесів *in vitro*. Культивування експлантів відбувалося у кімнаті з кондиційованим повітрям на скляних стелажах при температурі (25±1) °С, відносній вологості повітря

70—75%, тривалості фотоперіоду 16 год і штучному освітленні інтенсивністю 3—5 тис. люкс. Посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища готували за загальноприйнятими методиками [1, 3, 6].

Результати досліджень та їхнє обговорення

Технологічний процес мікроклонального розмноження рослин *C. siliquastrum* у культурі *in vitro* включав декілька послідовних етапів: стерилізація рослинного матеріалу, введення в культуру *in vitro*, підбір та оптимізація живильних середовищ, одержання рослин-регенерантів. Успіх роботи значною мірою залежав від вдалого вибору експланта, зокрема, від його онтогенетичного стану та часу введення в культуру. Результати наших досліджень свідчать, що експланти, введені в культуру навесні (10—25 травня), були найбільш придатними до органогенезу, оскільки в цей період у материнських рослин підвищується гормональний статус. Щодо онтогенетичного розвитку, то найбільший морфогенний потенціал мали рослини, які не вступили у стадію генеративного розвитку.

Покривні тканини всіх органів рослин заражені спорами епіфітних мікроорганізмів і грибів, тому при введенні апікальної меристеми в культуру *in vitro* необхідно підібрати стерилізатори, а також визначити відповідні концентрації та час експозиції.

Для підвищення ефективності дії основного стерилізатора застосовували ступінчастий процес стерилізації. Експланти попередньо обробляли мильним розчином, етанолом протягом 20 с і власне стерилізаторами. Як стерилізуючі речовини використовували: 2,5% гіпохлорид натрію (NaOCl), 0,1% дихлорид ртуті (HgCl₂) та 1,0% нітрат срібла (AgNO₃), час експозиції кожного стерилізатора становив 5, 10 і 15 хв. Після промивання у стерильній воді експланти висаджували на модифіковане нами живильне середовище Мурасіге—Скуга (МС) [7]. Упродовж 7 діб у кожному з варіантів визначали ефек-

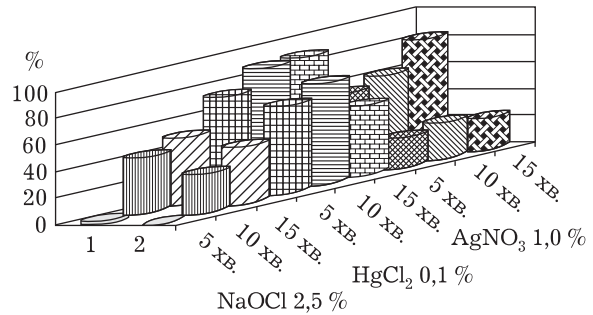


Рис. 1. Ефективність стерилізації експлантів *C. siliquastrum*: 1 — кількість стерильних експлантів, %; 2 — кількість життєздатних експлантів, %

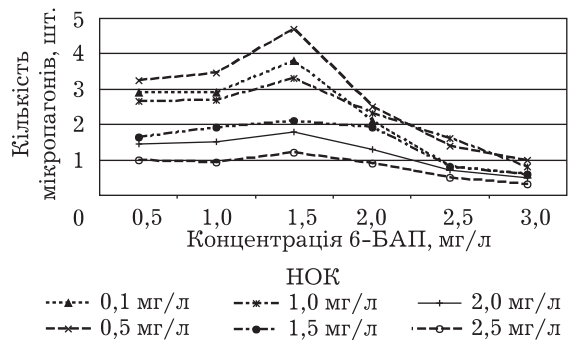


Рис. 2. Вплив концентрацій 6-БАП і НОК на кількість мікропагонів

тивність стерилізації, підраховуючи відсоток стерильних та інфікованих експлантів. Життєздатність експлантів оцінювали через 25 діб (рис. 1).

При аналізі кількості стерильних та інфікованих експлантів після застосування стерилізаторів встановлено, що найменш ефективним є гіпохлорид натрію. При його застосуванні (експозиція 2,5—10 хв) отримали 2,1—44,7% стерильних експлантів. Найбільший відсоток стерильних мікропагонів (74,5—89,7%) одержано при стерилізації у 0,1% HgCl₂, з них 53,5—78,0% були життєздатними. Після дії нітрату срібла цей показник становив 22,7—27,3%, а після дії гіпохлориду натрію — 0,3—44,5%. Слід зазначити, що при збільшенні часу дії HgCl₂ понад 10 хв експланти втрачали свою жит-



Рис. 3. Мікророзмноження *C. siliquastrum*

тездатність і були непридатні для подальшого культивування.

Отримані стерильні пагони розділяли на експланти довжиною 10—15 мм і висаджували для активації морфогенезу на середовище МС з вмістом агар-агару — 0,7% та сахарози — 3% і додаванням 6-бензиламінопурину (6-БАП) — 0,5—3,0 мг/л та нафтилоцтової кислоти (НОК) — 0—2,5 мг/л (рис. 2).

Встановлено, що високі концентрації 6-БАП (2,5—3,0 мг/л) та НОК (1,5—2,5 мг/л) стимулювали утворення калюсу на базальних кінцях мікропагонів, а низькі — ні, і експланти після двох тижнів культивування гинули.

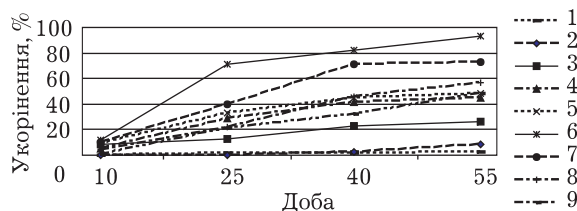


Рис. 4. Динаміка вкорінення мікропагонів *C. siliquastrum* залежно від експозиції та модифікації базового середовища: 1—9 — варіанти дослідів

В результаті застосування зазначених комбінацій НОК та БАП встановлено, що при мікророзмноженні рослин *C. siliquastrum* найбільш ефективними були такі концентрації фітогормонів: БАП — 1,5 мг/л, НОК — 0,5 мг/л (див. рис. 2).

При культивуванні на такому середовищі через 34—45 днів у експлантів спостерігався активний ріст як центрального пагона, так і формування додаткових адвентивних пагонів (рис. 3).

Упродовж наступних 25—35 днів було сформовано від 2 до 8 пагонів. Експланти завдовжки 3—5 см відокремлювали від материнської рослини та розділяли на частини розміром близько 2—3 см завдовжки (з однією пазушною брунькою кожен) для подальшого мікроклонального розмноження.

У ході експерименту було досліджено вплив різних концентрацій (0,1—1,5 мг/л) індолилмасляної кислоти (ІМК) та часу експозиції (15 і 30 днів) на індукцію ризогенезу (рис. 4). Варіанти дослідів: 1 — контроль (середовище без гормонів); 2 — 0,1 мг/л — 15 днів; 3 — 0,1 мг/л — 30 днів; 4 — 0,5 мг/л — 15 днів; 5 — 0,5 мг/л — 30 днів; 6 — 1,0 мг/л — 15 днів; 7 — 1,0 мг/л — 30 днів; 8 — 1,5 мг/л — 15 днів; 9 — 1,5 мг/л — 30 днів.

Таблиця. Ефективність ризогенезу мікроклонів *C. siliquastrum* залежно від часу експозиції та концентрації ІМК

Варіант	ІМК		Кількість укорінених мікроклонів, %			
	концентрація, мг/л	експозиція, днів	10-та доба	15-та доба	30-та доба	45-та доба
1	0,0	—	0,4	1,3	1,8	2,9
2	0,1	15	0,0	0,0	2,4	8,2
3	0,1	30	8,3	13,0	22,6	26,0
4	0,5	15	5,1	29,2	41,9	44,5
5	0,5	30	12,5	33,2	45,1	48,4
6	1,5	15	14,5	71,0	81,8	92,9
7	1,0	30	20,5	40,0	71,6	72,6
8	1,0	15	4,2	22,4	45,5	56,8
9	1,5	30	1,1	20,9	32,3	47,9



Рис. 5. Ризогенез у рослин *C. siliquastrum*

Під час експерименту встановлено, що рослини, які досягли довжини 3—5 см та мали 3—4 справжніх листки, перед укоріненням необхідно пересаджувати на живильне середовище з ІМК (1 мг/л) та сахарозою (20 мг/л) і вирощували на ньому 15 діб (див. рис. 4, таблицю), з подальшим перенесенням пагонів на середовище без гормонів.

Через 45—56 діб у результаті диференціювання клітин і тканин, спостерігали масовий прояв одного з типів морфогенезу — ризогенезу (рис. 5). Упродовж 60—68 діб було одержано понад 90 % регенерантів, що мали корені.

Найскладнішим етапом у процесі мікророзмноження є адаптація рослин до природних умов зростання. На цьому етапі загибель висаджених рослин іноді досягає 80—100%. Це пов'язано, на нашу думку, з аномальним розвитком кореневої системи під впливом ауксину, порушенням водного обміну у рослин-регенерантів, зумовленим підвищеною транспірацією та зниженою здатністю до фотосинтезу пересаджених з пробірок укорінених рослин.

Використання різноманітних субстратів практично не збільшувало виживання пересаджених з пробірок рослин, однак кращі результати (70—80% виживання рослин) було одержано при введенні додаткової стадії (4-та стадія мікророзмноження — адаптація), на якій вкорінені рослини пересаджували з пробірок у стерильний субстрат (торф:перліт:пісок—1:1:1). Стерильні умови підтримували протягом 4—5 тижнів. При цьому у пересаджених рослин відбувався інтенсивний ріст верхівки пагона, спостерігалось здерев'яніння стебла та утворення розгалуженої кореневої системи. Після цього етапу рослини висаджували для адаптації в умови *in vivo*.

Значне підвищення рівня виживання рослин при введенні додаткової стадії пов'язано, на нашу думку, з тим, що спочатку відбувається перебудова характеру живлення рослин-регенерантів у бік збільшення їхньої автотрофності (в субстраті відсутні екзогенні вуглеводи, вітаміни), а потім рослини пристосовуються до природних умов існування. Введення двоступеневої адаптації забезпечило виживання і ріст 70—80% рослин у нестерильних умовах.

Висновки

1. Найбільший відсоток стерильних експлантів (74,5—89,7%) одержано при поверхневій стерилізації 0,1% розчином дихлориду ртуті. Життєздатними були 53,5—78,0% стерильних експлантів.

2. При мікророзмноженні рослин *C. siliquastrum* найефективнішими були такі концентрації фітогормонів: БАП — 1,5 мг/л, НОК — 0,5 мг/л.

3. Для індукції ризогенезу експланти спочатку культивували на середовищі з 1,0 мг/л ІМК протягом 15 діб, а потім — на середовищі без гормонів.

1. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. — М.: Наука, 1975. — 50 с.

2. Ветчинкина Е.М., Мамаева Н.А. Некоторые аспекты использования эмбриокультуры рода *Iris* L. // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка "Інтродукція та збереження рослинного різноманіття". — К.: ВПЦ "Київський університет", 2005. — С. 15—16.

3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. — К.: Наук. думка, 1980. — 487 с.

4. Колдар Л.А. Інтродукція видів роду *Cercis* L., інтродукованих у Правобережний Лісостеп України та перспективи використання їх у зеленому будівництві. — Умань: Уманське ВПП, 2006. — С. 122.

5. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.

6. Черевченко Т.М., Кушнір Г.П. Орхидеи в культуре. — К.: Наук. думка, 1986. — 200 с.

7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — **15**, N 13. — P. 473—497.

Рекомендувала до друку
А.М. Лаврентьева

Л.А. Колдар, М.В. Небыков

Национальный дендрологический парк "Софиевка" НАН Украины, Украина, г. Умань

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ *CERCIS SILIQUASTRUM* L.

Приведены результаты микроклонального размножения растений *Cercis siliquastrum* L. в условиях культуры *in vitro*, стерилизации растительного материала, подбора и модификации питательных сред с целью получения растений-регенерантов, пригодных для использования в условиях *in vivo*.

L.A. Koldar, M.V. Nebykov

National Arboretum Park *Sofiyivka*, Ukraine, Uman

MICROCLONAL REPRODUCTION OF *CERCIS SILIQUASTRUM* L. PLANTS

The investigation results of microclonal cloning of the plants *C. siliquastrum* L. in the *in vitro* culture are given. Sterilization data of plant material, selection and modification of nutrient mediums to get plants-regenerants which can be used in the *in vivo* conditions are stated.