

МОРФОГЕНЕЗ CLADRASTIS KENTUKEA (DUM.-COURS.) RUDD В УМОВАХ IN VITRO

Досліджено стерилізацію рослинного матеріалу та особливості мікроклонального розмноження Cladrastis kentukea (Dum.-Cours.) Rudd в умовах in vitro, підібрано живильне середовище. Встановлено залежність морфогенезу експлантів від гормонального складу живильного середовища.

Ключові слова: експланти, стерилізатори, живильне середовище, морфогенез, регулятори росту, Cladrastis kentukea (Dum.-Cours.) Rudd, in vitro.

Залучення нових видів рослин до інтродукційного випробування сприяє розширенню асортименту деревних порід. Високодекоративні види збагачують кольорову палітру насаджень та підвищують естетичну цінність паркового комплексу. До таких видів належить північноамериканський інтродуцент Cladrastis kentukea (Dum.-Cours.) Rudd з родини Fabaceae Lindl. [4, 8].

C. kentukea використовують у паркових насадженнях та для озеленення населених пунктів. Особливо декоративними рослини є в період масового цвітіння, коли на дереві утворюється велика кількість білих запашних квіток, зібраних у довгі звисаючі китиці. Стовбур дерева сіруватого кольору з гладенькою корою, крона — широка, розлого-гілляста. Листки до 30 см завдовжки, складаються з 5–7 (11) еліптичних або оберненояйцеподібних листочків 8–13 см завдовжки та 2–7 см завширшки, світло-зелених блискучих влітку та золотисто-жовтих восени.

Вид є також перспективним для використання в народному господарстві як медонос. Деревина є цінною сировиною для меблевої промисловості [9].

C. kentukea — малопоширена рослина, росте лише в ботанічних садах та деяких

старовинних парках [6, 7]. Насіння C. kentukea має низьку схожість (до 24 %) при висіві необробленим, тоді як скарифіковане насіння має схожість 66 % [9]. При вегетативному розмноженні зеленими живцями обкорінення становило 20–50 % [1]. Тому для збільшення кількості садивного матеріалу ми пропонуємо використовувати розмноження в культурі in vitro як один із перспективних способів вегетативного розмноження.

Мета досліджень — підібрати оптимальні умови для введення в культуру in vitro Cladrastis kentukea, варіанти стерилізації рослинного матеріалу; модифікувати живильні середовища для індукції морфогенезу; встановити залежність коефіцієнта розмноження рослин від вмісту регуляторів росту.

Матеріал та методи

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

Як первинні експланти використовували пагони C. kentukea завдовжки 1,0–1,5 см з апікальною меристемою. Матеріал відбирали у розсаднику НДП «Софіївка» з рослин, які не досягли генеративної стадії, впродовж активного росту їх пагонів.

Технологічний процес мікроклонального розмноження рослин *C. kentukea* у культурі *in vitro* складався з декількох послідовних етапів: стерилізація рослинного матеріалу, введення в культуру *in vitro*, підбір та оптимізація живильних середовищ, одержання рослин-регенерантів.

Перед стерилізацією з пагонів видаляли листки, після чого рослинний матеріал промивали у проточній водопровідній та дистильованій воді, протирали марлевою серветкою, змоченою у 70 %-му етанолі. Підготовлені експланти поміщали у стерильний посуд і послідовно обробляли розчинами стерилізуючих реагентів.

Стерилізацію проводили в декілька етапів (попередній та основний). Для підвищення ефективності дії стерилізатора експланти попередньо обробляли 1,0 % розчином комерційного препарату «Манорм» (ВІК-А, Україна) впродовж 1 хв. Як основні стерилізуючі речовини використовували: 0,1 % дихлорид ртуті (HgCl_2) та 1,0 % нітрат срібла (AgNO_3). Після стерилізації експланти тричі промивали стерильною дистильованою водою (по 15 хв) та виса-

джували їх на модифіковані нами живильні середовища. Впродовж 7 діб у кожному з варіантів визначали ефективність стерилізації, підраховуючи відсоток стерильних та інфікованих експлантів. Життєздатність введених експлантів оцінювали через 25 діб.

Усі середовища стерилізували в автоклаві за температури 120 °С і тискові 1 атм упродовж 20 хв.

Умови культивування: температура — (25±1) °С, фотоперіод — 16 год, освітленість — 3000–5000 лк, відносна вологість повітря — 70 %.

Посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища стерилізували відповідно до загальноприйнятих методик [5].

Результати та обговорення

На ефективність введення рослин у культуру *in vitro* впливають різні чинники, основними з них є тип стерилізуючої речовини, тривалість обробки нею та фаза росту донорської рослини.

У результаті досліджень встановлено, що найбільшу частку життєздатних мікропагонів (36,75–80,0 %) можна одержати при стерилізації 0,1 % HgCl_2 (рис. 1).

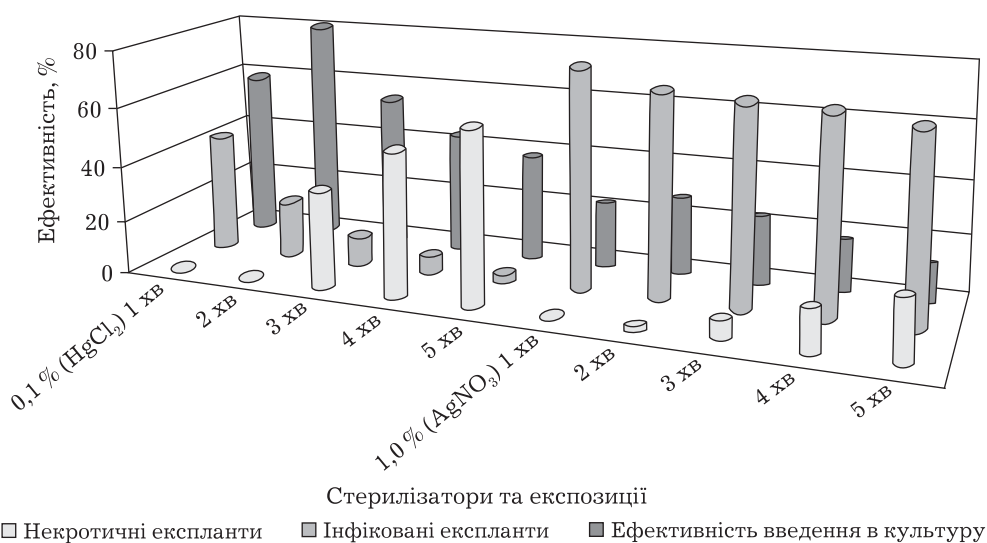


Рис. 1. Ефективність введення в культуру *in vitro* експлантів *Cladrastis kentukea*



Рис. 2. Стерильні та життєздатні експланти *Cladonia kentukea*

При збільшенні експозиції 0,1 % водного розчину $HgCl_2$ понад 4–5 хв у 51,5–61,0 % пагонів виникає некроз тканин. При обробці рослинного матеріалу 1,0 % водним розчином $AgNO_3$ у всіх варіантах спостерігали високий рівень інфікованих рослин (66,5–77,3 %), ефективність введення в культуру *in vitro* експлантів *C. kentukea* становила 12,6–27,3 %.

Оптимальним для введення експлантів в культуру *in vitro* виявився такий режим

Таблиця 1. Фітогормональний склад живильного середовища МС, мг/л

Середовище	6-БАП	Кінетин	ІОК	НОК	ІМК	2,4-Д
МС ₁₅₆	2,0	–	–	–	–	–
МС ₂₈₄	1,0	–	–	–	–	–
МС ₁₉₃	0,5	–	0,1	–	–	–
МС ₂₅₅	2,0	–	–	–	–	0,05
МС ₂₄₁	0,5	–	–	0,1	–	–
МС ₂₈₅	2,5	–	–	–	–	–
МС ₂₀₉	0,8	–	–	–	0,3	–
МС ₂₇₉	1,0	1,0	–	–	–	–
МС ₂₄₄ (контроль)	–	–	–	–	–	–

стерилізації: 1,0 % розчин комерційного препарату «Манорм» упродовж 1 хв та 0,1 %-й розчин $HgCl_2$ упродовж 2 хв (рис. 2). При цьому ураження грибовою та бактеріальною інфекціями було незначним (20 %), некрозу рослинних тканин не спостерігали.

Успіх роботи значною мірою залежав від вдалого вибору експланта (від його онтогенетичного стану та часу введення в культуру).

Результати проведених експериментальних досліджень підтвердили висновок Ф.Л. Калініна та ін. [3] про те, що експланти, введені в культуру навесні (10–25 травня), є найбільш придатними до органогенезу, оскільки в цей час у материнських рослин підвищується рівень ендогенних регуляторів росту. Найбільший морфогенний потенціал у процесі онтогенетичного розвитку мали рослини, які не вступили у стадію генеративного розвитку [2].

Для вивчення індукції морфогенезу в експлантів *C. kentukea* в культурі *in vitro* проведено дослідження впливу мінеральних складових живильних середовищ GD [10], WPM [11] і Мурасіге–Скуга (МС) [12]. Найактивніше пагоноутворення спостерігали на середовищі МС, яке містило мезоінозит (100 мг/л), вітаміни згідно з прописом, 3 % сахарози, 0,6 % агар-агару, рН 5,6–5,8. Це середовище обрано як базове для вивчення гормонального впливу на проліферацію мікропагонів *C. kentukea*. Для стимуляції пагоноутворення випробували 6-фурфуриламінопурин, 6-бензиламінопурин (6-БАП), β-індолілоцтову кислоту (ІОК), α-нафтилоцтову кислоту (НОК), β-індолілмасляну кислоту (ІМК), 2, 4-дихлорфеноксицтову кислоту (2,4-Д) у різних концентраціях.

Оцінку ефективності середовищ та розрахунок коефіцієнта розмноження проводили після другого пасажу. Дослідження дали змогу відібрати оптимальні середовища, які забезпечували коефіцієнт розмноження понад 2 (табл. 1).

Додавання до живильного середовища БАП у високих концентраціях (2,0–2,5 мг/л) збільшувало коефіцієнт розмноження, але такі концентрації негативно впливали на анатомічну структуру експлантів, про що свідчила висока частка вітрифікованих пагонів (табл. 2). На середовищі МС₂₈₅ зафіксовано 56 % експлантів з ознаками вітрифікації.

Культивування експлантів на середовищі МС₂₇₉ з додаванням 1,0 мг/л БАП та 1,0 мг/л кінетину спричиняло розвиток незначної кількості пагонів та адвентивних бруньок, які характеризувались уповільненим ростом.

Використання МС₂₈₄ з 1,0 мг/л БАП без додавання ауксинів сприяло утворенню максимальної кількості пагонів, середня довжина яких становила 1,6 см.

У результаті проведених досліджень встановлено, що на середовищах МС₁₉₃ (БАП — 0,5 мг/л, ІОК — 0,1 мг/л) та МС₂₄₁ (БАП — 0,5 мг/л, НОК — 0,1 мг/л) коефіцієнт розмноження становив 6,8 та 4,9 відповідно.

На живильному середовищі МС₂₀₉ з додаванням 0,8 мг/л БАП та 0,3 мг/л ІМК спостерігали значний приріст мікропагонів, високу морфогенну здатність, збільшення кількості міжвузлів. Коефіцієнт розмноження становив 8,5. Культивування експлантів на цьому середовищі забезпечило як активний ріст центрального пагона, так і формування додаткових адвентивних пагонів на 18–24-ту добу (рис. 3).

У процесі розмноження отримані пагони субкультивували кожні 35–50 діб, для цього експланти завдовжки 3–6 см відокремлювали від материнської рослини та розділяли на частини близько 2–3 см завдовжки.

Дослідження органогенезу *C. kentukea* в умовах *in vitro* та методів обкорінення одержаних пагонів для подальшої адаптації рослин в умовах *ex vitro* та їх вирощування у відкритому ґрунті тривають.

Таблиця 2. Залежність пагоноутворення від регуляторів росту та їх концентрацій

Середовище	Довжина пагонів, см	Кількість пагонів, шт.	Коефіцієнт розмноження	Вітрифікація, %
МС ₁₅₆	3,65±0,14	4,50±0,21	8,20±0,40	38,4
МС ₂₈₄	1,67±0,06	6,10±0,28	5,10±0,24	—
МС ₁₉₃	2,83±0,11	4,78±0,22	6,80±0,32	—
МС ₂₅₅	3,43±0,16	1,67±0,20	2,90±0,11	17,7
МС ₂₄₁	2,60±0,09	3,80±0,18	4,90±0,22	—
МС ₂₈₅	2,67±0,12	5,67±0,26	7,60±0,36	56,0
МС ₂₀₉	3,50±0,15	4,85±0,23	8,50±0,41	—
МС ₂₇₉	2,40±0,08	4,67±0,22	5,60±0,25	—
МС ₂₄₄ (КОНТРОЛЬ)	2,23±0,07	1,33±0,05	1,50±0,06	—



Рис. 3. Експланти *Cladrastis kentukea* на 18–24-ту добу

Висновки

1. Оптимальним строком для введення в стерильну культуру мікропагонів *Cladrastis kentukea* є друга і третя декада травня.

2. Найбільшу частку стерильних експлантів (80,0 %) одержано при поверхневій стерилізації 0,1 % водним розчином HgCl₂ при експозиції 2 хв.

3. При мікророзмноженні рослин *C. kentukea* найбільш ефективним було живильне середовище МС₂₀₉ з додаванням 0,8 мг/л БАП та 0,3 мг/л ІМК, на якому коефіцієнт розмноження становив 8,5.

1. Билык Е.В. Размножение древесных растений стеблевыми черенками и прививкой. — К.: Наук. думка, 1993. — 90 с.

2. Биотехнология сельскохозяйственных растений: Пер. с англ. В.И. Негрука. — М.: Агропромиздат, 1987. — 301 с.

3. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. — К.: Наук. думка, 1992. — 232 с.

4. Кормилицын А.М. Деревья и кустарники арборетума Государственного Никитского ботанического сада // Тр. Никит. ботан. сада. — 1960. — Вып. 32. — С. 173–213.

5. Кушнir Г.П., Сарнацка В.В. Мікроклональне розмноження рослин. — К.: Наук. думка, 2005. — 272 с.

6. Мисник Г.Е. Сроки и характер цветения деревьев и кустарников. — К.: Наук. думка, 1976. — 392 с.

7. Озеленение населенных мест / Под ред. А.И. Барбарича, А.Я. Хархоты. — К.: Изд-во Акад. архитектуры УССР, 1952. — С. 254–256.

8. Рубцов Л.И. Деревья и кустарники в ландшафтной архитектуре. — К.: Наук. думка, 1977. — 270 с.

9. Чепинога Т.І. Про культуру віргілії або кладрастиса жовтого на Україні. — К.: Наук. думка, 1966. — С. 104–111.

10. Gresshoff P.M., Doy C.H. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato) // Planta. — 1972. — 107. — P. 161–170.

11. Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture // Proc. Inter. Pl. Prop. Soc. — 1980. — 30. — P. 421–427.

12. 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.

Рекомендував до друку Р.В. Іванніков

М.В. Небиков, О.Л. Порожнява

Национальный дендрологический парк «Софиевка» НАН Украины, Украина, Черкасская обл., г. Умань

MORFOGENEЗ CLADRASTIS KENTUKEA (DUM.-COURS.) RUDD В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Исследована стерилизация растительного материала и особенности микроклонального размножения *Cladrastis kentukea* (Dum.-Cours.) Rudd в условиях in vitro, подобрана питательная среда. Установлена зависимость морфогенеза эксплантов от гормонального состава питательных сред.

Ключевые слова: экспланты, стерилизаторы, питательная среда, морфогенез, регуляторы роста, *Cladrastis kentukea* (Dum.-Cours.) Rudd, in vitro.

М.В. Небиков, О.Л. Порожнява

National Dendrological Park *Sofiyivka*, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, Cherkassy District, Uman

MORPHOGENESIS OF CLADRASTIS KENTUKEA (DUM.-COURS.) RUDD UNDER IN VITRO

The sterilization of plant material, selection and modification of nutrient mediums and peculiarities of microclonal breeding of the *Cladrastis kentukea* (Dum.-Cours.) Rudd in vitro were investigated. The dependence of the explants morphogenesis from hormonal composition of nutrient mediums is considered.

Key words: explants, sterilizers, nutrient medium, morphogenesis, growth regulators, *Cladrastis kentukea* (Dum.-Cours.) Rudd, in vitro.