

Т.І. Віценя, молодший науковий співробітник,
Інститут овочівництва та баштанництва НААН

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СЕРЕДНЬОТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ КОЛЕКЦІЙ ЧАСНИКУ

Досліджено способи середньотривалого зберігання рослин часнику з використанням культури тканин для створення та підтримки колекцій часнику, який розмножується вегетативно. У якості чинників, які уповільнювали ріст рослин було використано зниження температури зберігання до +4 °С разом із зниженням рівня поживних елементів в середовищі, а також включення до складу поживного середовища підвищених концентрацій сахарози.

Ключові слова: колекційні зразки, часник, зберігання *in vitro*, поживне середовище, рослини – регенеранти.

Вступ. Селекція сільськогосподарських культур тісно пов'язана з постійним зберіганням і відновленням великої кількості зразків насіння – колекційного матеріалу, селекційно – генетичних форм тощо.

Збереження генетичного різноманіття рослин, що вегетативно розмножуються більш складний і трудомісткий процес, ніж збереження насінневих колекцій. Специфікою збереження цієї категорії генофонду є велика залежність від умов вирощування. Колекції картоплі, часнику та деяких інших культур потребують щорічної висадки на плантації у повному обсязі. Усі ці культури потребують періодичного оздоровлення від вірусних хвороб. Значного і непередбаченого негативного впливу на колекційні насадження та плантації завдають зміни в оточуючому середовищі як антропогенні, так і природні [2].

Для вирішення вищезазначених проблем в даний час активно ведеться розробка методів тривалого зберігання пробіркових рослин. До теперішнього часу накопичений великий експериментальний матеріал в галузі збереження рослин в умовах *in vitro*, описано дуже велика кількість методів. В остаточному підсумку всі способи утримання колекцій *in vitro* можна розділити на дві категорії:

- пересадкові колекції або зберігання в умовах нормального

© Віценя Т.І., 2010.

росту;

- депоновані колекції, в яких рослини знаходяться в умовах уповільненого росту.

Зберігання в умовах нормального росту передбачає звичайний метод розмноження, тому при такому способі зберігання необхідна регулярна пересадка на свіжі поживні середовища, забезпечення стабільних умов культивування (температура, вологість, освітленість, склад поживного середовища), що робить цей метод дорогим і трудомістким.

При постійних пересадках рослинного матеріалу з одного поживного середовища на інше виникає ряд небажаних явищ: порушення стерильності, втрата морфогенетичного потенціалу рослин та їх загибель. Тому цей спосіб використовують для сезонного накопичення пробіркових рослин перед висадкою їх у нестерильні умови. Також такі колекції є основою для розробки методів збереження в умовах температур, близьких до 0 ° С, які дозволяють домогтися подовження періодів збереження пробіркових рослин за рахунок скорочення кількості пересадок [10, 12].

Більш економічним способом підтримки колекцій є депонування рослинного матеріалу, тобто подовження періоду між пересадками об'єктів. Депонування дозволяє зменшити витрати праці та часу, скоротити витрати на реактиви, використовуючи відносно просте лабораторне обладнання.

Уповільнення росту рослин відбувається за рахунок зниження температури культивування, добору відповідного складу газового середовища, спектрального складу світла [13].

Ефективним прийомом, який затримує ріст пробіркових рослин, є зміна мінерального складу культуральних середовищ, видалення або зниження рівня вмісту поживних елементів, що забезпечують оптимальний ріст, веде до затримки росту і розвитку.

Третій спосіб пов'язаний з включенням до складу штучних живильних середовищ різних ретардантів (абсцизова кислота, ССС, гідразид малеїнової кислоти та інші), а також осмотично активних речовин (маніту, сорбіту, сахарози) [14].

До теперішнього часу розроблені методики стримування росту в культурі *in vitro* для багатьох плодових, овочевих та декоративних культур. Таким чином, для кожного виду рослин прийоми зберігання в умовах мінімального росту специфічні. Розробка та вдосконалення цих методів дозволяє створювати колекції рослинних об'єктів *in vitro*.

Унаслідок відносної простоти цей метод набув найбільшого поширення. Практично всі існуючі колекції пробіркових рослин зберігаються в умовах мінімального росту. Депоновані, як і пересадкові колекції служать не тільки для безпосереднього зберігання рослин, вони також є складовою частиною програм кріозберігання - найбільш складного і, безумовно, найбільш перспективного способу збереження генетичних ресурсів.

Мета роботи – розробка способу середньотривалого зберігання (до 5 років) в умовах *in vitro* активної колекції часнику шляхом оптимізації вмісту поживних елементів та концентрації осмотичного агента в середовищах та температурних режимів при безпересадковому культивуванні пробіркових рослин.

Методика досліджень. У своїх дослідженнях ми користувалися методичними рекомендаціями, викладеними в роботах Р. Г. Бутенко [1], Ф. Л. Калініна, В. В. Сарнацької і В. Е. Поліщука [4]. Досліди виконували, користуючись стандартним обладнанням лабораторії, відповідно до методики досліджень в культурі ізольованих тканин овочевих рослин [7]. Кількість об'єктів в одному варіанті ми обирали, згідно даних А. М. Широконоса і В. В. Мацкевича [11]. Математичну обробку одержаних даних здійснювали за Б. О. Доспеховим [3] та Г.Ф. Лакіним [5].

У якості вихідного матеріалу було використано сорт часнику Дюшес селекції ІОБ УААН.

Для культивування рослинних об'єктів в якості базового середовища використовували середовище Мурасіге і Скуга (МС) з додаванням тіаміну, пиридоксину і аскорбінової кислоти – по 1мг/л.

На першому етапі при вивченні впливу низьких позитивних температур на тривалість зберігання пробіркових рослин в якості первинного експланту застосовували апікальні меристеми, розміром 0,5-1мм, які виділяли під біокуляром при 16-кратному збільшенні з ростових точок зубків, які знаходилися в стані спокою і розміщували на живильне середовище МС, доповнене 0,5мг/л БАП і 0,1мг/л ІоцК. Стерилізацію зубків, з яких виділяли меристеми проводили в ламінарному боксі в такій послідовності: рослинний матеріал занурювали у розчин 70% етилового спирту на 5-10 секунд; далі обробляли шляхом занурення у 2,6% розчин гіпохлориту натрію за експозиції 20 хвилин та промивали матеріал не менше 5 разів стерильною дистильованою водою. На кожен окремий досліджуваний варіант висаджувалось 30 експлантів.

На другому етапі при вивченні впливу сахарози на тривалість зберігання у якості первинного експланту застосовували меристемні тканини молодих суцвіть. Дезинфекцію матеріалу проводили 70% етанолом протягом 5 хвилин, що забезпечувало 100% стерильність матеріалу. Верхню частину суцвіття зрізали, базальну частину висаджували на живильне середовище МС доповнене 0,1мг/л БАП, 0,1мг/л ЮцК, 50мг/л аденіну для індукції пагоноутворення. Отримані пагони відокремлювали від суцвіття і висаджували на середовище МС без гормонів для коренеутворення.

Рослинний матеріал вирощували при температурі від 22 °С до 26 °С з 16-годинним фотоперіодом та інтенсивністю освітлення, що відповідає типу донорського експланту: меристеми – при 2 – 3 клк у перший місяць культивування і 5 клк - протягом наступних місяців; адвентивні пагони – при 5клк.

При відпрацюванні культивацийного циклу тривалого зберігання рослин *in vitro*, відбувалось чергування вирощування рослин в стандартних умовах (за температурою від 22 °С до 26 °С з 16-годинним фотоперіодом та інтенсивністю освітлення 5 клк) і зберігання в холодильнику при температурі 4°С протягом 12 місяців. (рис.1)

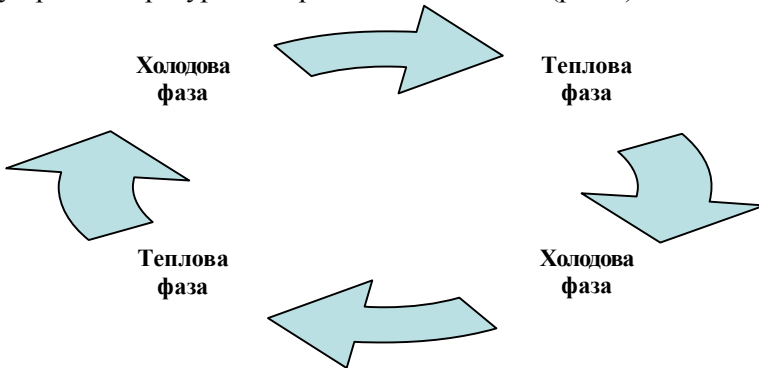


Рис. 2.1. Повний культивацийний цикл тривалого зберігання.

Рослини-регенеранти, отримані з апікальних меристем, які культивувалися протягом 3-4 міс., добре укорінені, пересаджували на живильні середовища з різним мінеральним складом: 1/2МС і МС. Після цього їх було закладено на зберігали при температурі 4°С в темноті на період 3, 6, 9 і 12 міс.

Після проходження терміну депонування, рослини переносили в стандартні для культивування регенерантів умови і пересаджували на свіже поживне середовище. Визначався вплив на життєздатність

рослин-регенерантів безпересадочного культивування за умов низьких позитивних температур (+4°C) тривалістю 3, 6, 9 і 12 місяців.

При дослідженні впливу сахарози на збереженість рослин – регенерантів під час тривалого депонування рослини, отримані з меристемних тканин молодих суцвіть, які культивувалися протягом 3 місяців, добре розвинені, були висаджені на поживні середовища МС з різним вмістом сахарози (45, 60, 90 і 120 г/л). і закладені на зберігання при температурі 22-24°C на 12 місяців.

Облік одержаних результатів проводили наприкінці терміну зберігання.

Результати досліджень. У досліді проводили відпрацювання культиваційного циклу тривалого зберігання рослин *in vitro*, при якому відбувалось чергування вирощування рослин в стандартних умовах (за температурою від 22 °С до 26 °С з 16-годинним фотоперіодом та інтенсивністю освітлення 5 клк) і зберігання в холодильнику при температурі 4°C. Після 3 місяців зберігання життєздатність рослин становила 88,0-88,6%, решта рослин виявилась інфікованою (табл. 1). Після 6 міс. зберігання життєздатність рослин була на рівні 100%. При термінах зберігання 3 і 6 місяців гідратованих рослин не виявлено. Різний склад живильних середовищ, на яких було проведено зберігання суттєво не вплинуло на життєздатність рослин.

1. – Життєздатність рослин – регенерантів часнику після безпересадочного зберігання, 2006р.

Термін зберігання, місяців	Середовище для зберігання	Кількість життєздатних рослин		Кількість гідратованих рослин		Кількість Інфікованих рослин	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
3	½ МС	31	88,6	0	0	4	11,4
	МС	22	88,0	0	0	3	12,0
6	½ МС	29	100,0	0	0	0	0
	МС	27	100,0	0	0	0	0
9	½ МС	27	96,4	0	0	1	3,6
	МС	25	89,3	0	0	3	10,7
12	½ МС	27	96,4	0	0	1	3,6
	МС	25	89,3	0	0	3	10,7

Життєздатність рослин – регенерантів після 9 місяців зберігання на середовищі ½ МС становила 96,4%, що є достатньою для зберігання колекційних зразків. Життєздатність рослин – регенерантів після 12 місяців де-

понування без пересадки на середовищі $\frac{1}{2}$ МС становила 96,4%, гідратованих рослин на цьому середовищі не виявлено.

Під час тривалого зберігання при понижених температурі в темноті відбувається часткове відмирання листя на рослині. Після видалення відмерлого листя рослини були висаджені на середовище МС з додаванням 0,1 мг/л кінетина, 0,1 мг/л ЮцК для відновлення росту.

Через 30 днів рослини пересаджувалися на свіже живильне середовище без гормонів. Основне культивування проводили на середовищі без гормонів, щоб запобігти гіпергідратації клітин і виключити ризик соматональних варіацій [51].

Після культивування в стандартних умовах протягом 2-3 місяців, добре розвинені рослини знову перенесені в умови з низькими позитивними температурами. Цикл тривалого зберігання *in vitro* рослин-регенерантів було проведено протягом 3 років з постійним чергуванням теплої та холодної фази.

З літературних джерел відомо, що зберігання при температурі +4 °С проводили за умов освітлення і фотоперіоду. Ми проводили зберігання в побутовому холодильнику, де неможливо було встановити освітлення. Після зберігання пробіркових рослин в темноті при температурі +4 °С рослини виходять ослабленими із-за відсутності світла під час зберігання. Відновлення росту рослин, що пройшли період зберігання відбувалося повільно, тому нами було застосовано введення до складу середовища для зберігання підвищених концентрацій сахарози, яка є осмотично активною речовиною, підвищує осмотичний тиск і створює ефект посухи і затримує ріст рослин.

У своїх дослідженнях з вивчення впливу підвищених концентрацій сахарози у поживному середовищі на зберігання рослин за температури 22-24 °С до складу середовища для депонування було введено підвищені концентрації сахарози, з метою уповільнення росту рослин – регенерантів, що зберігалися при нормальній температурі протягом 12 місяців. Проведені обліки, представлені в таблиці 2.

Після зберігання рослин протягом 12 місяців при температурі 24°С на варіанті 4, де вміст сахарози в середовищі становив 120 г/л, життєздатність рослин істотно відрізнялась від контролю і ця концентрація сахарози істотно уповільнювала приріст листків. На середовищі з вмістом сахарози 45г/л (вар.1), яке слугувало контролем, частка життєздатних рослин становила $31,0 \pm 2,5\%$, інші рослини на цьому варіанті були нежиттєздатними, до них відноситься також частка гідратованих рослин, яка становила $7,7 \pm 1,6\%$, ріст при пересадці яких був відсутній. Кількість листків на одній рослині, що були утворені за період

депонування, становила $9,8 \pm 1,5$. Варіант 2 істотно не відрізнявся від контролю за рівнем життєздатних рослин і приросту листків. На варіанті 3 життєздатність рослин істотно відрізнялася від контролю, а приріст листків і кількість гідратованих рослин була в межах контролю. Після закінчення терміну депонування рослини були пересаджені на свіже поживне середовище з стандартним вмістом сахарози, через 15 днів культивування були поведені обліки, представлені в таблиці 3.

2. – Вплив підвищених концентрації сахарози в живильному середовищі на ріст рослин – регенерантів під час зберігання протягом 12 місяців, 2009 р.

№ варіанта	Концентрація сахарози, г/л	Кількість утворених листків,	Розвиток кореневої системи, бали	Кількість життєздатних рослин, %	Кількість гідратованих рослин, %
1	45 (контроль)	$9,8 \pm 1,5$	5	$31,0 \pm 2,5$	$7,7 \pm 1,6$
2	60	$10,6 \pm 2,0$	5	$45,0 \pm 3,2$	$5,0 \pm 1,5$
3	90	$8,7 \pm 1,1$	5	$56,7 \pm 3,5$	$3,3 \pm 1,2$
4	120	$6,8 \pm 1,4$	5	$84,9 \pm 4,7$	0
НІР ₀₅		2,3		24,2	4,3

3. – Вплив тривалого зберігання рослин при підвищених концентраціях сахарози в живильних середовищах на ріст рослин при пересадці на стандартне середовище, 2009р.

№ варіанта	Концентрація сахарози, г/л	Кількість рослин зі слабким ростом (1лист), %	Кількість рослин з нормальним ростом (3-4 лист), %
1	45(контроль)	100	0
2	60	100	0
3	90	$35,3 \pm 5,3$	$60,0 \pm 7,6$
4	120	0	100

На варіанті 4 всі рослини висаджені на свіже середовище мали нормальний ріст, на рослині утворилося 3-4 нові листки і вони мали інтенсивно зелений колір.

Рослини, що залишилися життєздатними на варіанті 1(контроль) і варіанті 2, при пересадці на свіже поживне середовище мали слабку динаміку росту, на рослині утворився один лист і вони були блідо зеленого кольору. На варіанті 3 добре розвивалися $60,0 \pm 7,6\%$ рослин з

тих що залишилися життєздатними після депонування, решта мала слабкий ріст. Отже, підвищення концентрації сахарози до 120 г/л в середовищі для депонування значно уповільнює ріст і дає можливість отримати 84,9±4,7% життєздатних рослин через 12 місяців зберігання. Цей вміст сахарози не має негативного впливу на ріст рослин при переносі їх на свіже живильне середовище з стандартним вмістом сахарози.

Висновки. Показано, що для створення в культурі *in vitro* активної генетичної колекції часнику середньострокового зберігання (до 5 років) рослини – регенеранти доцільно депонувати як за низької позитивної температури (+4°C), які уповільнюють ріст, так і за стандартних температурних умов (+24°C) при застосуванні середовищ з підвищеним вмістом сахарози (120 г/л). Підвищення концентрації сахарози в живильному середовищі значно уповільнює ріст пробіркового матеріалу і дає можливість отримати 84,9±4,7% життєздатних рослин через 12 місяців зберігання. Матеріал збережений за таких умов має високий морфогенний потенціал. Культивуваційний цикл складається з чергування культивування за стандартних умов на середовищі МС за температурних умов +24°C (2-3 місяці), потім зберігання при температурі +4°C протягом 12 місяців або зберігання на середовищі з підвищеною концентрацією сахарози (120 г/л) за температурних умов +22-24°C.

Бібліографія.

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – С. 13-80.
2. Гавриленко Т. И. Стратегия долгосрочного сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды / Т. И. Гавриленко, С. Е. Дунаева // Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: труды II Вавиловской международной конференции. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 161-163.
3. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. - М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
4. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. - К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
5. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – С. 18-237.
6. Оптимизация условий длительного *in vitro* хранения некоторых образцов родов *Rubus* и *Fragaria* / Ю. В. Лупышева, З. Х. Пазова,

С. У. Дунаева, Т. А. Гавриленко // Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: труды II Вавиловской международной конференции. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 174-176

7. Методика досліджень в культурі ізольованих тканин овочевих рослин / [В. П. Мірошніченко, О. Ф. Сергієнко, Т. В. Івченко, С. А. Гончарова, С. І. Кондратенко, Н.О. Баштан] – Мерефа: ІОБ УААН. – 2004. – 25 с.

8. Мохаммед Абдулваси Ибрахим Микроразмножение, длительное депонирование и криосохранение *in vitro* малины красной: автореф. дис. на соиск. науч. степени канд. биол. наук / Мохаммед Абдулваси Ибрахим – М.: Всерос. НИИ с.-х. биотехнологии, 1998. – 17 с.

9. Мусин С. М. Биотехнология картофеля: создание, депонирование, управление оздоровленным генобанком и его использование в производстве исходного материала / С. М. Мусин // Достижения науки и техники АПК. – 2002. – N 11. – С. 8 – 11.

10. Трускинов Э. В. Коллекции *in vitro* на современном этапе итродукции, использования и хранения мирового генофонда вегетативно размножаемых культур сельскохозяйственных растений / Э. В. Трускинов // Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: труды II Вавиловской международной конференции. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 207-209

11. Широконос А.М. Оптимальні вибірки рослин у дослідженнях картоплі в культурі *in vitro* / А. М. Широконос, В. В. Мацкевич // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34. – № 4. – С. 353-359.

12. Филипенко Г. И. Низкотемпературное хранение и криоконсервация мировой коллекции ВИР / Г. И. Филипенко, О. Н. Забегаева, Е. А. Баранова // Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: труды II Вавиловской международной конференции. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 209-210.

13. Keller E.R.J. Experience of *in vitro* storage and criopreservation of *Allium* at IPK / E.R.J.Keller, A. Senula. – Gatersleben, Germany. – 2002. . – С. 19-26.

14. Negri V. Genetic stability in micropropagated and slow-growth cultured shoots of apple genotypes / V. Negri; N. Tosti // Ann. della Fac. di agraria / Univ. degli studi di Perugia. – 2002. – Vol. 53, – P. 71-76.

Т. И. Вицня Биотехнологические аспекты средне-продолжительного хранения коллекций чеснока.

Резюме. Исследовано влияние состава питательных элементов и концентраций осмотического агента в питательной среде и температурных режимов на безпересадочное культивирование пробирочных растений чеснока. Выявлено, что для создания в культуре *in vitro* активной генетической коллекции чеснока растения – регенеранты следует хранить как в условиях низких положительных температур, задерживающих рост растений, так и при стандартных температурах с использованием питательных сред с увеличенным содержанием сахарозы (120 г/л). Увеличение концентрации сахарозы в питательной среде значительно задерживает рост пробирочных растений и дает возможность получить 84,9±4,7% жизнеспособных растений при безпересадочном культивировании в течение 12 месяцев.

T. I. Vitsenia. BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF MEDIUM-TERM GARLIC COLLECTIONS STORAGE

Summary. The present articles studies influence of nutrient content and osmotic agent concentration in growth media and temperature condition on non-transplantation cultivation of garlic test-tube plants. The research findings show that creating an active genetic garlic collection *in vitro* cultures requires regenerants to be stored in low (4°C) as well as standard (22-24°C) temperature conditions with the use of growth media with high sucrose content (120 grams per liter). The increase in sucrose content considerably slows down the test-tube material development and provides 84,9±4,7% viable plants with non-transplantation cultivation for 12 moth period.