

УДК 633.63: 58.085: 631.53.02

ПОЛІЩУК В.В., канд. с.-г. наук

Уманський національний університет садівництва

СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПРОРОСТКІВ ВИХІДНИХ ФОРМ ГІБРИДІВ БУРЯКУ ЦУКРОВОГО ДЛЯ ВВЕДЕННЯ *IN VITRO*

Наведено результати досліджень з оптимізації техніки підготовки проростків вихідних форм гетерозисних гібридів буряку цукрового для введення *in vitro*, а також підбору стерилізатора, його концентрації, експозиції обробки та інших параметрів проведення ефективної стерилізації. Встановлено особливості застосування загальнозживаних і нових стерилізаторів та підбрано оптимальні режими для ефективної стерилізації проростків буряку цукрового.

Ключові слова: цукрові буряки, гібрид, проростки, стерилізація, вихідні форми.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень та публікацій. Протягом останніх десятиріч методи біотехнології знаходять все більше застосування в селекції рослин та насінництві [1–5, 7, 10, 19]. Трав'янисті рослини, такі як суниця, картопля, багато овочевих, квітково-декоративних, деякі лікарські та інші здатні до вегетативного розмноження традиційними методами культури, успішно вводяться *in vitro* і можуть досягати високих показників коефіцієнта розмноження [4, 5]. Прискорене розмноження дефіцитних генотипів *in vitro* має сенс лише тоді, коли в процесі мікроклонування спадковість розмножуваної особини залишається недоторканою [5]. Мікророзмноження, тобто вегетативне розмноження *in vitro*, нині стає все більш широкозживаним методом у селекційно-генетичних дослідженнях з буряком цукровим (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima* Doell convar. *saccharifera* (Alef.) Krass.) [11, 12, 16, 17]. Хоча буряк цукровий, як і решта видів роду *Beta* L. неспроможний до природного вегетативного розмноження, однак вдаючись до стимулювання розвитку пазушних (а іноді й адвентивних) бруньок можна клонувати найбільш цінні генотипи традиційними методами, не вдаючись до техніки *in vitro* [9, 18]. На жаль, кількість таких бруньок дуже низька [14, 15], що перешкоджає широкому використанню природних способів вегетативного розмноження буряку цукрового. Розмноження *in vitro* найбільш вдало поєднує переваги щодо збереження спадковості певних ознак розмножуваних генотипів, зокрема чоловічу стерильність та інші господарчо цінні ознаки, з підвищеними коефіцієнтами розмноження.

У культуру *in vitro* можуть бути введені експланти, заготовлені з різних частин рослини (коренів, пагонів, листків, апікальних меристем тощо), однак кращі результати дає стартовий матеріал зі швидкими темпами росту і розвитку [5, 15]. Процес мікроклонального розмноження, незалежно від типу експлантів, можна умовно розділити на чотири головні етапи: стерилізація рослинного матеріалу і введення експлантів на живильне середовище; проліферація (швидке розмноження); гемо- і ризогенез (індукування розвитку мікропагонів і коренів) і адаптація до нестерильних умов *ex vitro* [15].

Стерилізація належить до найважливіших компонентів технології розмноження *in vitro*. На поверхні вегетуючої рослини і її частин, листків, бруньок, проростків та інших джерел експлантів, знаходиться велика кількість різноманітних мікроорганізмів, які здатні рости і розмножуватись на живильному середовищі. У процесі свого росту та розвитку гриби і бактерії не тільки поглинають поживні речовини живильного середовища, а також гальмують ростові процеси в експлантах і в наступному, якщо рослина не загинула, всі біологічні процеси рослини. Тому від якості стерилізації залежить успіх подальшого культивування [1, 4, 12].

У процесі вибору технології стерилізації і власне стерилізатора біотехнолог намагається звільнити поверхню рослинного матеріалу від будь-яких мікроорганізмів, мінімізуючи небезпеку пошкодження експлантів стерилізатором, до складу кожного з яких входять досить токсичні речовини [4, 5, 13].

У результаті усвідомлення значення стерилізації, як одного з найбільш відповідальних етапів мікроклонального розмноження, нами було поставлено **за мету** з'ясувати особливості застосування загальнозживаних і нових стерилізаторів та підібрати оптимальні режими для ефективної стерилізації проростків буряку цукрового.

Методика досліджень. За розробленою нами методикою, апробованою на кукурудзі [6], насіння вихідних чоловічо-стерильних форм буряку цукрового пророщували у чашках Петрі на зволоженому дистильованою водою фільтрувальному папері.

За експланти використовували двотижневі проростки, які в ламінар-боксі зрізали зі стерилізованого пророслого насіння пропареним при 180–200 °С скальпелем і негайно переносили простерилізованим (разом зі скальпелем) пінцетом на живильне середовище, приготуване за прописом Гамборга і Евелега (B5) [8], яке було модифіковане нами сірчаноокислим залізом ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) – 27,8 мг/л з антиоксидантом Na_2EDTA – 37,3 мг/л, а також додатково введеним Міо-інозитолом – 100 мг/л та збільшеним вмісту джерела вуглеводів до 27 г/л сахарози.

Як стерилізатори використовували хлорамін, дихлорид ртуті (сулема) та септодор-форте з різною концентрацією робочого розчину. Перед стерилізацією експлантів проводили промивання рослинного матеріалу милом і стерильною водою 15–20 хв, щоб з їхньої поверхні змити зовнішні грибково-бактеріальні інфекції.

Кількість висадженого матеріалу становила 100 штук для всіх видів стерилізації. Решту маніпуляцій з рослинним матеріалом виконували за загальноживаними методиками [1–4, 7, 10, 19].

Результати досліджень та їх обговорення. Дослідженнями встановлено, що за експозиції стерилізації до однієї хвилини вихід стерильних живців не перевищував нуля. При збільшенні експозиції від однієї до десяти хвилин майже на одному рівні були стерилізатори дихлорид ртуті 0,05 % і септодор-форте, вихід стерильних–життєздатних експлантів становив близько 50–58 %, а стерилізація рослинного матеріалу хлораміном давала найменший вихід живців — від 10 до 49 % (табл. 1).

Найефективнішою стерилізуючою речовиною для введення мікроживців в ізолювану культуру визначено 0,1 %-ий водний розчин дихлориду ртуті за експозиції 20 хвилин. Вихід стерильних–життєздатних експлантів у цьому варіанті дослідження в середньому складає 96 %. При збільшенні експозиції стерилізації вихід стерильних експлантів становить 100 %, однак вони нежиттєздатні.

Таблиця 1 – Ефективність стерилізації рослинного матеріалу залежно від типу стерилізатора і експозиції

Стерилізатор	Концентрація стерилізатора, %	Експозиція стерилізації, хв	Кількість неінфікованого матеріалу, %	Некроз експланта, %
Хлорамін	5	10	10	–
		15	14	–
		20	16	4
Хлорамін	10	10	14	–
		15	18	–
		20	20	6
Хлорамін	15	10	49	–
		15	78	6
		20	36	14
Дихлорид ртуті (сулема)	0,01	10	12	–
		15	19	–
		20	13	7
Дихлорид ртуті (сулема)	0,05	10	58	–
		15	66	4
		20	4	9
Дихлорид ртуті (сулема)	0,1	10	54	–
		15	82	2
		20	96	4
Септодор-форте	5	10	50	–
		15	78	4
		20	90	8

Однак, слід зазначити, що добрі результати було зафіксовано у стерилізатора хлорамін за 15 % концентрації та встановлено, що за експозиції 15 хвилин вихід стерильних–життєздатних експлантів становив 78 %. Також відмічено, що при збільшенні експозиції до 20 хв, як і у варіанті з сулемою, тканини рослин не витримували навантаження і гинули, а вихід життєздатних експлантів становив 36 %.

Ефективним стерилізатором виявився п'ятивідсотковий розчин септодор-форте, для якого при збільшенні експозиції стерилізації з 10 до 20 хвилин отримано вихід стерильного матеріалу на рівні 50–90 %.

Некроз експланта виявлено в усіх варіантах досліджень, однак найбільшу кількість загиблих живців встановлено для стерилізатора хлорамін 15 % за експозиції 20 хв.

Висновки. В результаті досліджень встановлено, що найефективнішим стерилізатором проростків насіння цукрових буряків є 0,1 % розчин сулеми за експозиції стерилізації 20 хв – 96 % стерильного матеріалу.

Стерилізатор септодор-форте 5 % за аналогічної експозиції забезпечив вихід стерильних живців на рівні 90 %, однак спостерігалось певне збільшення некрозу живців – 8 %, порівняно з попереднім варіантом – 4 %.

Збільшення експозиції стерилізації більш як 20 хвилин забезпечувало вихід стерильного матеріалу в межах 100 відсотків, однак рослини виявилися нежиттєздатними.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
2. Бутенко Р.Г. Культуры изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 93 с.
4. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
5. Опалко А.І. Використання методів біотехнології / А.І. Опалко, О.А. Опалко // Селекція плодкових і овочевих культур: навч. посіб. : Ч. 1. : Загальні основи селекції городніх рослин / за ред. А.І. Опалка. – Умань: НДП «Софіївка» НАН України, 2012. – С. 201–233.
6. Поліщук В.В. Удосконалення методів мікроклонального розмноження кукурудзи / В.В. Поліщук, І.В. Ковальчук, Д.М. Адаменко та ін. // Зб. наук. праць Уманського НУС. – Вип. 75. – 2011. – С. 139–149.
7. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярёв и др. – М.: Высш. школа, 1998. – 416 с.
8. Gamburg O. L. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley / O. L. Gamburg, D. E. Eveleigh // Canadian Journal of Biochemistry. – 1968. – Vol. 46, № 5. – P. 417–421.
9. Hussey G. Clonal propagation of sugarbeet plants and the formation of polyploids by tissue culture / G. Hussey, A. Nopher // Annals of botany. – 1978. – Vol. 42, №2. – P. 477–479.
10. Jha T.B. Plant tissue culture: Basic and applied / Timir Baran Jha, Biswajit Ghosha. – Hyderabad: Universities Press, 2005. – 206 p.
11. Klimek M. Influence of the ploidy level on growth and organogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *in vitro* / Magdalena Klimek, Rafał Barański // Acta biologica cracoviensia [Posters of 12th national conference “*In vitro* cultures”, Poznań 2009]. – 2009. – Series botanica. – P. 46.
12. Krens F.A. The role of explant source and culture conditions on callus induction and shoot regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) / F.A. Krens, D. Jamar // Journal of Plant Physiology – 1989. – Vol. 134, № 6. – P. 651–655.
13. Kutas E. The influence of sterilizing compounds on the yield of viable explants of *Rhododendron* L. (Ericaceae) Elena Kutas, Lyubov Ogorodnik // International journal of biodiversity and conservation. – 2011. – Vol. 3, №1. – P. 24–26.
14. Miedema P. Vegetative propagation of *Beta vulgaris* by leaf cuttings / P. Miedema, P.J. Groot, J.N.M. Zuidegeest // Euphytica. – 1980. – Vol. 29, № 2 – P. 425–432.
15. Mezei S. Sugar beet micropropagation / S. Mezei, L. Kovacev, N. Nagl // Biotechnology and biotechnological equipment. – 2006. – Vol. 20, № 1. – P. 9–14.
16. Petrus-Vancea A. Sugar beet (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera*) vitroculture initiation from encapsulated seeds / Adriana Petrus-Vancea, Nicolae Palcut, Anca Baciu // Analele universitatii din Oradea, Fascicula biologie. – 2009. – Vol. 16, № 1. – P. 91–93.
17. Ritchie G.A. *In vitro* shoot regeneration from callus, leaf axils and petioles of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) / G.A. Ritchie, K.C. Short, M.R. Davey // Journal of experimental botany. – 2009. – Vol. 40, № 2. – P. 277–283.
18. Saunders W. A Flexible *in vitro* shoot culture propagation system for sugarbeet that includes rapid floral induction of ramets 1, 2 / Joseph W. Saunders // Crop science. – 1982. – Vol. 22, № 6. – P. 1102–1105.
19. Singh M.P. Plant tissue culture / M.P. Singh, Sunil Kumar. – New Delhi: APH Publishing, 2009. – 286 p.

Стерилизация проростков исходных форм гибридов сахарной свеклы для введения *in vitro*

В.В. Полищук

Приведены результаты исследований по оптимизации техники подготовки проростков исходных форм гетерозисных гибридов сахарной свеклы для введения *in vitro*, а также подбора стерилизатора, его концентрации, экспозиции обработки и других параметров проведения эффективной стерилизации. Установлено особенности применения общепринятых и новых стерилизаторов, подобрано оптимальные режимы для эффективной стерилизации проростков сахарной свеклы.

Ключевые слова: сахарная свекла, гибрид, проростки, стерилизация, исходные формы.

Seedlings sterilisation of parental forms of sugar beets hybrids for input *in vitro*

V. Polishchuk

The results of research on optimization techniques of preparing seedlings output forms of sugar beet heterotic hybrids input in *in vitro*, as well as the selection of sterilizer, its concentration, exposure processing and other parameters of an effective sterilization.

Keywords: sugar beets, hybrid, seedlings, sterilization, output forms.