

УДК 631.53.03:634.724 (477.46)

КРАСНОШТАН Т.В., аспірант

Уманський національний університет садівництва

ЕКСПОЗИЦІЯ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ТА ПІДБІР СТЕРИЛІЗАТОРА ДЛЯ ВВЕДЕННЯ МІКРОЖИВЦІВ СМОРОДИНИ ЗОЛОТИСТОЇ (*RIBES AUREUM PURSH.*) *IN VITRO*

Досліджено особливості стерилізації експлантів та підбірано стерилізатор, його концентрацію, експозицію обробки для різних сортів смородини золотистої перед введення *in vitro*. Встановлено оптимальні строки для проведення ефективної стерилізації різних генотипів та вихід стерильного життєздатного рослинного матеріалу.

Ключові слова: смородина золотиста, стерилізатор, експозиція, концентрація, *in vitro*.

Постановка проблеми. Методи мікророзмноження було розроблено для різних представників роду *Ribes*, однак для різних представників цього роду характерна видова та сортова специфічність отриманих результатів клонування [11,12,15,16,17]. Тому для швидкого запровадження техніки *in vitro*, для розмноження сортів смородини золотистої у розсадництво, необхідно розробити та вдосконалити елементи технології мікроклонування [11].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Вегетативне розмноження *in vitro*, на сьогодні, стає все більш широковживаним методом для розмноження в рослинництві та садівництві [3,7,13,14], що порівняно з традиційними методами вегетативного розмноження дозволяє в короткі строки отримати велику кількість безвірусного матеріалу, генетично ідентичного материнській рослині [11].

Високий коефіцієнт розмноження, порівняно з іншими культурними рослинами *in vitro* мають трав'янисті рослини [9,10]. Однак, залишається проблема застосування методів біотехнології в розсадництві [2,5,8], хоча за останні роки є публікації про застосування методів мікроклонального розмноження для плодкових деревних і ягідних культур [1,2,3,4,6].

Успіх мікроклонального розмноження на всіх етапах введення *in vitro* передбачає наявність відпрацьованої технології мікророзмноження [11]. Найвідповідальнішим з етапів технології *in vitro* є стерилізація рослинних матеріалів, що вводять в культуру. На поверхні рослинного матеріалу, що вводиться на живильне середовище знаходиться велика кількість різних мікроорганізмів, що також ростуть і розмножуються на живильному середовищі. В результаті своєї життєдіяльності вони поглинають поживні речовини з живильного середовища і виділяють токсини, які гальмують всі біологічні процеси в рослині і призводять до її загибелі. Тому стерилізація експлантів є одним з основних елементів мікроклонального розмноження [3].

Мета і завдання досліджень – вивчити особливості впливу нових та широко застосовуваних стерилізаторів та підібрати оптимальні режими стерилізації мікроживців смородини золотистої.

Матеріали і методика досліджень. Роботу виконано в лабораторіях біотехнології кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва та Національного дендрологічного парку «Софіївка» протягом 2011-2012 рр.

За вихідний матеріал використано мікроживці смородини золотистої сортів Вишнева, Пирятинська та Дружна завдовжки 1–1,5 см (з однією брунькою). Для зрізу рослинного матеріалу використовували пропарені при 180–200 °С інструменти – скальпель і пінцет. Усі роботи проводили в обладнаних бактерицидними лампами спеціальних стерильних приміщеннях і ламінарних шафах з надлишковим тиском стерильного повітря.

Перед стерилізацією експлантів проводили промивання рослинного матеріалу господарським милом протягом 5 хв і стерильною водою протягом 15–20 хвилин, змивши зовнішні грибово-бактеріальні інфекції з їхньої поверхні, після чого проводили стерилізацію. Після чотириразового промивання експлантів у стерильній дистильованій воді, експланти висаджували на модифіковане живильне середовище Мурасіге і Скуга.

Кількість висадженого матеріалу становила 100 штук для всіх досліджуваних генотипів та видів стерилізації. Решту маніпуляцій з рослинним матеріалом виконували за загальноживованою методикою [11].

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті проведених досліджень вивчено наступні стерилізатори – гіпохлорид натрію (NaOCl), дихлорид ртуті (HgCl₂ – сулема), нітрат

срібла (AgNO_3) та септодор-форте з різною концентрацією робочого розчину та за різних експозицій.

Встановлено, що за експозиції стерилізації до однієї хвилини для всіх видів стерилізаторів вихід стерильних живців не перевищував нуля. Найбільш ефективним стерилізатором виявився дихлорид ртуті, з концентрацією 0,1 % та експозицією 15 хв, вихід стерильних експлантів становив 93 %, а життєздатних експлантів – 89 % (табл. 1).

Показники стерилізації мікроживців смородини золотистої при застосуванні нітрату срібла теж були достатньо високими. За концентрації 1,5 % та експозиції 15 хв вихід стерильного матеріалу становив 91 %, а життєздатність мікроживців за таких умов стерилізації – лише 18 %.

Ефективним було застосування стерилізатора септодор-форте. При концентрації 2,5 % та експозиції 15 хв ефективність стерилізації була 89 %, а життєздатність експлантів становила 81 %. При збільшенні концентрації до 5 %, вихід стерильних експлантів збільшувався залежно від експозиції від 89 до 95 %, однак життєздатність експлантів зменшувалась — від 15 до 9 % відповідно.

Найменш ефективним стерилізатором виявився гіпохлорид натрію. При його застосуванні у концентраціях 2 і 2,5 % та експозиції п'ять хвилин всі експланти виявились інфікованими. Однак, при концентрації 2,5 % та експозиції 15 хвилин спостерігався найвищий вихід стерильних експлантів — 44 %, але життєздатність їх була лише 19 %.

Висновки. В результаті досліджень встановлено, що найефективнішим стерилізатором для експлантів смородини золотистої є 0,1 % розчин дихлориду ртуті (HgCl_2) за експозиції стерилізації 15 хвилин. Вихід стерильного матеріалу становив 93 %, а вихід життєздатних мікроживців – 89 %.

Ефективним було застосування стерилізатора септодор-форте. За концентрації 2,5 % та експозиції 15 хв ефективність стерилізації була 89 %, а життєздатність експлантів становила 81 %. При збільшенні концентрації септодор-форте, ефективність стерилізації збільшувалась до 95 % за експозиції 15 хв, але життєздатність таких експлантів була низькою – 9 %.

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

Стерилізатор	Концентрація стерилізатора, %	Експозиція стерилізації, хв	Ефективність стерилізації, %	Життєздатність, %
Гіпохлорид натрію	2,0	5	0	0
		10	17	16
		15	23	18
Гіпохлорид натрію	2,5	5	0	0
		10	33	31
		15	44	19
Гіпохлорид натрію	3,0	5	25	21
		10	31	29
		15	32	17
Дихлорид ртуті (сулема)	0,01	5	13	12
		10	18	15
		15	23	20
Дихлорид ртуті (сулема)	0,05	5	44	39
		10	55	49
		15	67	63
Дихлорид ртуті (сулема)	0,1	5	70	67
		10	76	68
		15	93	89
Нітрат срібла	0,5	5	33	29
		10	48	37
		15	53	42
Нітрат срібла	1,0	5	55	36
		10	73	33
		15	82	26
Нітрат срібла	1,5	5	75	30
		10	83	21
		15	91	18
Септодор-форте	1,25	5	39	48
		10	58	69
		15	67	78
Септодор-форте	2,5	5	68	31
		10	73	75
		15	89	81

Септодор-форте	5	5	89	15
		10	91	12
		15	95	9

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бленда В.П. Використання мікроклонального розмноження при вирощуванні саджанців для елітних маточно-живцевих насаджень кісточкових культур / В.П. Бленда, А.В. Бленда, О.О. Созінов, І.В. Іващенко // Садівництво. – К., 1999. – Вип. 48. – С. 113–116.
2. Бондаренко П.С. Вивчення коренеутворення і мікропагонів клонових підщеп яблуні в культурі тканин / П.С. Бондаренко, В.Г. Ануфрієва, В.М. Удовиченко // Садівництво. — К.: Аграрна наука, 1998. – Вип. 46. – С. 133–135.
3. 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.
4. Бутенко Р.Г. Культуры изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. — М.: Наука, 1964. — 272 с.
5. Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение плодовых растений и декоративных кустарников: Сб. научн. тр. ВНИИС им. И.В. Мичурина / В.А.Высоцкий. — Мичуринск: Изд-во ВНИИС им. И.В. Мичурина, 1989. — С. 3–8.
6. Кондратенко П.В. Микроразмножение клоновых подвоев яблони / П.В.Кондратенко, В.М. Удовиченко // Информ. листок. — № 036–99. — К.: Киев ЦНТЭИ, 1999. — 4 с.
7. Корнацкий С.А. Культура тканей растений и адаптационные процессы в онтогенезе / С.А. Корнацкий // Садівництво. — К.: Аграрна наука, 1998. — Вип. 46. — С. 147–148.
8. Косенко І.С. Морфогенез регенерантів стеблових живців деревних рослин *in vitro* та *in vivo* / І.С.Косенко, О.В.Білик // Вивчення онтогенезу рослин природних та культивованих флор у ботанічних садах Євразії. — Львів, 1994. — С. 100–101.
9. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
10. Опалко А.І. Використання методів біотехнології / А.І. Опалко, О.А. Опалко // Селекція плодів і овочевих культур: навч. посіб.: Ч. 1. : Загальні основи селекції городніх рослин. — Умань: НДП «Софіївка» НАН України, 2012. — С. 201–233.
11. Поликарпова Ф.Я. Методические указания по клональному микроразмножению черной и красной смородины / Ф.Я. Поликарпова, В.А. Высоцкий, З.Т. Тарашвили. — М., 1986. — 15 с.
12. Тарашвили З.Т. Ускоренное размножение черной и красной смородины методом *in vitro*: автореф. канд. с.-х. наук / З.Т. Тарашвили. — М., 1985.— 23 с.
13. Ташматова Л.В. Методы культуры *in vitro* при размножении и депонировании форм груши / Л.В. Ташматова, В.Е. Джафарова // Садівництво. — К.: СЕРЖ, 2005. — Вип. 57. — С. 205–212.
14. Garton S. Production of native plants in tissue culture / S. Garton, M.S. Moses // Comb. Proc. Intern. Plant Propagators Soc. — 1986. — P. 306–316.
15. Karkonen A. Mikropropagation of several Japanese woody plants for horticultural purposes / A. Karkonen, L. Simola, T. Koponen // An. Bot. Fennici.— 1999. — №36. — P. 21-31.
16. Ruzic D. Mikropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black current cultivars / D. Ruzic, T. Lazic // Agric/ Consp. Sci. — 2006.— V.71 — №4. — P. 149-153.
17. Wainwright H. Studies of the mikropropagation of Ribes species / H. Wainwright, A. Flegman // Acta Hort.183. — 1986.— P.315-322.

Експозиція стерилізації і підбір стерилізатора для введення мікрочеренків смородини золотистої (*ribes aureum pursh.*) *in vitro*

Т.В. Красноштан

Исследованы особенности стерилизации эксплантов и подобран стерилизатор, его концентрация, экспозиция обработки для разных сортов смородины золотистой перед введением *in vitro*. Подобраны оптимальные сроки для проведения эффективной стерилизации разных генотипов, установлены особенности влияния стерилизаторов на выход стерильного и жизнеспособного растительного материала.

Ключевые слова: смородина золотистая, стерилизатор, экспозиция, концентрация, *in vitro*.

The exposure of sterilization and the selection of sterilizer for introducing of the microcuttings of the varieties of golden currant (*ribes aureum pursh.*) *in vitro*

T. Krasnoshtan

The peculiarities of sterilization of explants are researched, sterilizer, its concentration, exposure processing of the varieties of golden currant before introducing *in vitro* are selected. The terms of an effective sterilization of the varieties of golden currant are selected. The optimal time for effective sterilization of various genotypes and the yield of sterile viable plant material are determined. It was found that the most effective sterilizer for explants of golden currant is a 0.1% of mercury dichloride (HgCl₂), exposure of sterilization – 15 minutes. The yield of sterile material is 93%, and the yield of viable mikrocuttings - 89%. It is effective to use of sterilizer of septodor forte. The sterilization efficiency was 89%, and the viability of explants was 81% at the concentration of 2.5% and exposure 15 minutes. When the concentration of septodor forte was higher the efficiency of sterilization are increased to 95%, but the viability of explants was low - 9%.

Key words: golden currant, sterilizer, exposure, concentration, *in vitro*.