

6. Phyto-characteristics, cultivation and medicinal prospects of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) / A.A. Bah., F. Wang, Z. Huang [et al.] // International journal of agriculture and biology. — 2012. — Vol. 14. No. 4. — P. 650–657.
7. Wild *Allium* species (Alliaceae) used in folk medicine of Tajikistan and Uzbekistan / M. Keusgen, R.M. Fritsch, H. Hisoriev [at al.] // Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. — 2006. — No. 2(18). — P. 1–9.
8. *Dimitrova N.R.* Untersuchungen zur Charakterisierung ausgewählter pflanzlicher Inhaltsstoffe aus Pflanzen der Gattung *Allium*: dissertation of doctor rerum naturalium: 29.05.13 / N.R. Dimitrova. — Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 2013. — 147 p.
9. Yves Desjardins. Onion as a Nutraceutical and Functional Food / Yves Desjardins // *Chronica Horticulturae*. — 2008. — Vol. 48, No. 2. — P. 8–14.
10. *Vuzera С.М.* Фітонцидологія, стан і перспективи розвитку / С. М. Вигера // Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія: збірник статей міжнародної наукової конференції, Державний агроекологічний університет. — Житомир, 2005. — С. 218–222.
11. *Одум Ю.* Экология / Ю. Одум; [пер. с англ. Б.Я. Веленкина]. — М.: Мир, 1986. — Т. 2. — 328 с.
12. *Дьяков Ю.Т.* Популяционная биология фитопатогенных грибов / Ю.Т. Дьяков. — М.: Муравей, 1998. — 384 с.
13. Environmental detection of *Penicillium marneffei* and growth in soil microcosms in competition with *Talaromyces stipitatus* / E. Pryce-Miller, D. Aanensen, N. Vanittanakom [at al.] // *Fungal Ecology*. — Elsevier Ltd and The British Mycological Society. — 2008. — Vol. 1. — Part 1. — P. 49–56.
14. *Куприенко Н.П.* Болезни лука репчатого в Белоруси / Н.П. Куприенко. — Минск: Белприм, 2005. — 128 с.
15. Методы экспериментальной микологии / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др.; под ред. В.И. Билай. — К.: Наукова думка, 1982. — 548 с.
16. Определитель токсинообразующих микромицетов / В.И. Билай, З.А. Курбацкая. — К.: Наукова думка, 1990. — 236 с.
17. *Pitt J.I.* Fungi and food spoilage / J.I. Pitt, A.D. Hocking. — London, New York: Springer, 2009. — 519 p.
18. *Лемеза Н.А.* Иммунитет растений: практикум [для студентов биол. ф-та] / Н.А. Лемеза. — Минск: БГУ, 2008. — 96 с.

УДК 581.143.6

ЕКОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТРОФІЧНОЇ ТА ГОРМОНАЛЬНОЇ ДЕТЕРМІНАЦІЇ РИЗОГЕНЕЗУ *IN VITRO* РЕГЕНЕРАНТІВ ХОСТИ

А.П. Стадник, Л.М. Філіпова, В.В. Мацкевич

Білоцерківський національний аграрний університет

Проаналізовано трофічні та гормональні детермінанти ризогенезу хости in vitro. Встановлено, що детермінантами ризогенезу хости сортів Патріот і Паульс Глорі є низка чинників: індуковане вирощування рослин-донорів експлантів в умовах тривалого світлового дня та довгий фотоперіод під час регенерації рослин з експлантів (16 год); додавання в середовище індолілоїної кислоти в концентраціях 1–4 мг/л; вирощування регенерантів на збіднених за мінеральною основою середовищах та додавання активованого (1,5 г/л) або деревного (2,5 г/л) вугілля; зменшення кількості цитокініну у штучних живильних середовищах. Доведено, що зменшення концентрації мінеральних речовин та додавання вугілля дає змогу зменшити використання індолілоїної кислоти до 1 мг/л.

Ключові слова: ауксин, детермінант, експлант, клональне мікророзмноження, регенерант, хоста, цитокінін.

Адаптація рослин-регенерантів до умов вирощування *ex vitro* є завершальним ета-

пом клонального мікророзмноження того чи іншого виду. У сучасних дослідженнях з культурою рослинних тканин процес перенесення рослин-регенерантів у природ-

© А.П. Стадник, Л.М. Філіпова, В.В. Мацкевич, 2014

не середовище виділено в окремий етап морфогенезу [1]. Але недосконалість технологічних прийомів на сьогодні істотно знижує ефективність розмноження їх *in vitro*. Тому необхідно удосконалити процес адаптації регенерантів як поодиноких цінних екземплярів, так і за масового промислового виробництва.

Культивування рослин в умовах *in vitro* зумовлює зміни щодо кількості і співвідношення фітогормонів, ферментів, що своєю чергою змінює хід метаболічних реакцій і, відповідно, утворення та діяльність органів рослинного організму. У скляній тарі за стабільних волого-температурних умов рослини формують легкоуразливі невеликі листки, в яких постійно відкриті продиhi, тонкі стебла та слабозвинену кореневу систему [2].

Рослини *in vitro* не мають потреби формувати розвинену кореневу систему внаслідок розміщення коріння у штучних живильних середовищах, забезпечених легкодоступними вологою та елементами живлення [3]. Коренева система, утворена *in vitro*, часто характеризується відсутністю корневих волосків та коренів другого порядку. Як наслідок, корені мають невелику площу живлення й слабку поглинальну здатність, що також негативно проявляється на етапі їх адаптації до нових умов росту [4].

Звикання регенерантів до специфічного комплексу чинників *in vitro* спричиняє адекватні пристосувальні реакції рослин. Але в звичайних умовах, після пересадки регенерантів *ex vitro*, такі пристосування виявляються недоцільними, оскільки відбувається незворотне зневоднення рослин-регенерантів [5], що зумовлює зміни у їх гормональному статусі. Якщо в ювенільних переважають ауксини й цитокінін над абсцизинами, то за потрапляння під дію несприятливих умов *in vivo* зростає кількість останніх [6]. Тому існує гіпотеза, що абсцизова кислота (АБК) необхідна для підтримки оптимального водного балансу і запобігання надлишковим втратам води [7].

Поступове зневоднення пагона зумовлює зростання рівня АБК у коренях [8].

Окрім впливу на продиhi, відзначають й стимулюючу дію цього гормону на водну провідність коренів [9]. Накопичення АБК часто співпадає зі зменшенням вмісту цитокініну. Як відомо, ці гормони є антагоністами в процесах регуляції інтенсивності транспірації [10].

Мета досліджень — аналіз трофічних та гормональних детермінант ризогенезу хости *in vitro* за допомогою вивчення індукції та утворення ризосфери експлантами під дією різних детермінант ризогенезу, що поряд із регуляцією водообміну є найважливішими складовими постасептичної адаптації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рослини хости сортів Патріот і Паульс Глорі культивували за асептичних умов у біологічних пробірках зі штучним живильним середовищем за Мурасіге і Скугом з додаванням ауксинів (індолілолійна кислота — ІОЛК, індолілоцтова кислота — ІОЦК) і цитокініну (6-бензиламінопурин БАП) у різних концентраціях та з використанням різних концентрацій мінеральної основи й вугілля різного типу (деревного й активованого). Повторність дослідів — чотириразова, з 30 експлантами у варіанті.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час культивування на середовищах з невисоким умістом ауксинів та цитокініну (БАП, ІОЛК — по 0,75 мг/л) встановлено зміни коренеутворення регенерантів, індуковані впливом умов вирощування рослин-донорів експлантів (табл. 1). Регенеранти з експлантів, що ізольовані із рослин-донорів, вирощених за тривалого фотоперіоду, швидше розпочинали коренеутворення. Так, для сорту Патріот різниця становила 7,1 дня, а для сорту Паульс Глорі — 5,8 дня. Цей чинник також впливав на кількість та довжину коренів. У регенерантів сорту Патріот ця різниця зростала із 1,2 до 3,7 шт./рослину, а довжина збільшувалася із 4,3 до 8,9 мм.

Умови вирощування безпосередньо самих регенерантів ще більше впливали на ризогенез. За тривалішого фотоперіоду

Таблиця 1

Вплив фотоперіоду культивування рослин-донорів експлантів на ризогенез регенерантів хости

Фотоперіод, годин	Початок коренеутворення, днів		Розвиток кореневої системи регенерантів на 45-й день культивування			
			довжина, мм		кількість коренів, шт.	
	Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі
8	28,7	31,2	4,3	3,2	1,2	1,1
16	21,6	25,4	8,9	8,4	3,7	4,9
НІР ₀₅	2,1	3,3	3,2	3,0	0,9	0,8

Таблиця 2

Вплив фотоперіоду культивування на ризогенез регенерантів хости

Фотоперіод, годин	Початок коренеутворення, днів		Розвиток кореневої системи регенерантів на 45-й день культивування			
			довжина, мм		кількість коренів, шт.	
	Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі
8	26,2	27,7	7,3	4,7	3,1	3,8
16	17,9	20,6	12,7	17,3	5,8	6,2
НІР ₀₅	1,1	2,7	2,2	2,5	1,5	1,7

регенеранти швидше і у більшій кількості утворювали корені (табл. 2). Між рослинами сорту Патріот різниця за початком утворення коренів становила 8,3 дня, а сорту Паульс Глорі — 9,1 дня. Відмінності у розвитку кореневої системи залежно від умов освітлення були більшими, ніж між варіантами з експлантатами, отриманими з рослин-донорів, вирощених за різних умов освітлення.

Ризогенез у регенерантів відбувається згідно із правилом Скуга — Міллера [11]. За переважання у живильному середовищі ауксинів відбувається коренеутворення, а у разі більшої кількості цитокініну — кушіння (пагоноутворення) (рис. 1).

Під час підбору виду та концентрації ауксинів виявлено такі залежності: ІОцК порівняно із

ІОлК виявилася не ефективною для коренеутворення на обох сортах. Причиною цього може бути те, що ІОлК меншою мірою стимулює синтез етилену порівняно з



Рис. 1. Вплив гормонів на морфогенез регенерантів хости сорту Патріот: ліворуч — надлишок ауксинів (ІОлК 4 мг/л), праворуч — надлишок цитокініну (БАП 2,5 мг/л).

ІОцК. Також відомо, що ІОлК є активнішим ауксином порівняно з ІОцК, а однодольні рослини своєю чергою потребують в середовищах більших концентрацій ауксинів порівняно із дводольними [1].

Збільшення концентрацій ІОлК від 1 до 3 мг/л прискорювало початок коренеутворення, збільшувало як кількість, так і довжину коренів. Слід відзначити різницю між регенерантами вирощеними на середовищах із 2, 3 і 4% ІОлК. Зростання концентрації ІОлК у цих межах за вирощування регенерантів сорту Патріот збільшувало довжину коренів із 12,8 до 36,9 мм та зменшувало кількість коренів із 6,9 до 4,1 шт./рослину. Під час збільшення концентрації ІОлК до 5% проявлявся фітотоксичний вплив — зменшувалася кількість коренів та їх довжина, більшість рослин мали калюсні утворення навколо місць травмування під час живцювання.

Застосування іншого ауксину — 2,4Д в концентраціях 3 та 4 мг/л — було ефективним для збільшення кількості коренів, але вони мали меншу довжину. Концентрація понад 5 мг/л була фітотоксичною.

Для багатьох культур чинником детермінування ризогенезу є зменшення концентрації елементів мінерального живлення в середовищі [11]. Це підтверджено й нашими дослідженнями на хості. Збіднене вдвічі

середовище стимулювало ріст кореневої системи. На цьому середовищі дія ауксинів проявлялася як з високою (3 мг/л), так і з низькою концентраціями (1 мг/л). При вищій концентрації ауксинів регенеранти за кількістю коренів поступалися рослинам, що виростили на середовищі з 1 мг/л ІОлК, але переважали за довжиною коренів.

Про вплив на ризогенез детермінованих невисоких концентрацій (MS 1/2) свідчить утворення коренів навіть за зменшених концентрацій ауксинів, що не відбувалося за повної мінеральної основи (табл. 3). Однак за відсутності ауксинів (ІолК) у середовищі з половинною концентрацією мінеральних речовин у регенерантів спостерігалася пригнічення росту й розвитку (рис. 2), у т.ч. й ризогенезу.

Окрім перелічених, відомим детермінантом ризогенезу є активоване вугілля. Припускають, це обумовлено зв'язуванням інгібіторів гормонів, затіненням та додатковою аерацією середовища. Щоб зменшити витрати на активоване вугілля за великих обсягів розмноження, нами випробувано заміну цього компонента на звичайне деревне вугілля, отримане внаслідок неповного спалювання деревини плодкових дерев.

Порівнянням попередньо підібраних оптимальних концентрацій встановлено, що немає чіткої різниці в застосуванні цих

Таблиця 3

Вплив концентрації мінеральної основи та ІОлК на ризогенез регенерантів хости

Концентрація		Початок коренеутворення, днів		Розвиток кореневої системи регенерантів на 45-й день культивування			
мінеральна основа	ІОлК, мг/л			довжина, мм		кількість коренів, шт.	
		Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі
Повна	–	50,1	52,8	–	–	–	–
	1	16,4	24,0	12,6	16,8	6,2	6,8
	3	13,8	18,4	28,7	31,3	5,1	4,1
1/2	–	37,4	41,6	2,3	2,9	1,1	1,4
	1	14,4	19,5	15,9	17,2	7,1	7,3
	3	13,2	17,8	67,9	76,5	6,6	7,1
НІР ₀₅		2,3	1,8	2,0	1,5	2,2	1,7

видів вугілля (табл. 4). Отже, застосування одного з видів вугілля дає змогу зменшити витрати на ІОЛК і використання дешевшого деревного вугілля, що замінює активоване вугілля.

Укорінення мікропагонів безпосередньо після умов *in vitro* в субстраті можна розглядати як спосіб одночасного укорінення та адаптації. Застосовуються два способи дії індукторів ризогенезу на мікропагін – введення в середовище і замочування. Нами випробувано технологічний прийом замочування регенерантів хости впродовж 30 хв у 5% розчинах на фоні вирощування розсади за різних концентрацій цитокиніну – БАП (табл. 5).



Рис. 2. Вплив концентрації мінеральної основи живильного середовища на розвиток регенерантів хости сорту Патріот: 1 – повна, 2 – половинна концентрації

Таблиця 4

Вплив активованого, деревного вугілля та ІОЛК на ризогенез регенерантів хости (MS 1/2)

Концентрація		Початок коренеутворення, днів		Розвиток кореневої системи регенерантів на 45-й день культивування			
Тип вугілля	ІОЛК, мг/л			довжина, мм		кількість коренів, шт.	
		Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі
Активоване 1,5 г/л	–	21,1	32,3	14,3	7,7	3,0	3,7
	1	12,7	15,8	42,7	46,1	7,4	6,6
	3	11,9	14,0	48,3	51,6	7,9	8,0
Деревне 2,5 г/л	–	19,5	28,6	37,3	38,9	2,7	3,1
	1	14,4	19,5	45,2	47,2	7,1	7,3
	3	11,2	15,8	47,9	46,5	7,6	8,1
НІР ₀₅		2,1	2,7	4,3	5,6	2,6	2,2

Таблиця 5

Вплив замочування регенерантів хости сорту Патріот у розчинах ауксинів на її приживлюваність та ризогенез

БАП, мг/л	Ауксин	Прижилось рослин, %	Кількість коренів, шт.	Довжина кореневої системи, мм
Без гормонів		41	0,6	12
0	ІОЛК	76	7	29
	2,4 Д	63	9	13
1,0	ІОЛК	47	8	7
	2,4 Д	38	9	4
2,5	ІОЛК	25	3	6
	2,4 Д	23	4	2

Регенеранти з найбільшою серед досліджуваних концентрацій (2,5 мг/л) БАП порівняно із безгормональним контролем знижували приживлюваність та ризогенез. Так встановлено, що дія ауксинів була вищою на середовищах без цитокиніну. Збільшення кількості БАП зменшувало приживлюваність, кількість та довжину коренів.

ВИСНОВКИ

Детермінантами ризогенезу за мікроклонального розмноження хости сортів Патріот і Паульс Глорі є:

- вирощування рослин-донорів експлантів за умов індукованої тривалості світлового дня та довгий фотоперіод під час регенерації рослин з експлантів;
- додавання в середовище ІОЛК в концентраціях від 1 до 4 мг/л;
- вирощування регенерантів на збіднених за мінеральною основою середовищах;
- додавання активованого або деревного вугілля;
- зменшення кількості цитокиніну в штучних живильних середовищах.

Зменшення концентрації мінеральних речовин та додавання вугілля дає змогу зменшити використання ІОЛК до 1 мг/л.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. — К.: Наукова думка, 2005. — 267 с.
2. Зеленина Г.А. Мікроклональне розмноження та особливості водного обміну регенерантів *Arnica foliosa* // Вісник Одеського національного університету. — 2005. — Т. 9, вип. 5. — С. 7–11.

3. *Moreira M.F.* Anatomical aspects of IBA-treated microcuttings of *Gamphrena macrocephala* St.-Hil / M.F. Moreira, B. Appezzato-Gloria, L.B.P. Zaidan // *Braz. Arch. Biol. and Technol.* — 2000. — No. 43 (2). — P. 44–48.
4. Адаптація растений-регенерантов с использованием гидропоники / Н.А. Вечернина, О.Л. Тавартклизде, И.Д. Бородулина, А.А. Эрст // *Известия АлтГУ.* — 2008. — № 3 (55). — С. 7–10.
5. *Гиголашвили Т.С.* Условия микроклонирования формируют специфический культуральный фенотип / Т.С. Гиголашвили, О.Н. Родкин, В.Г. Реуцкий // *Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда: тез. докл. VII Междунар. конф. (Москва, 25–28 ноября 1997 г.).* — М., 1997. — С. 413.
6. *Таран О.П.* Регенераційна здатність рослин картоплі за дії абіотичних чинників у культурі картоплі *in vitro* та *ex vitro*: Автореф. дис. ... канд. біол. наук за спеціальністю 03.00.12 — фізіологія рослин / О.П. Таран. — К., 2011. — 21 с.
7. *Wareing P.F.* Abscisic acid as a natural growth regulator / P.F. Wareing // *Phil. Trans. Roy. Soc. London. B.* — 1978. — No. 284. — P. 483–498.
8. Growth, transpiration and hormonal response of wheat seedlings to heat temperature stress / A. Mitrychenko, I. Teplova, R. Farkhutdinov et al. // 11th Congress of FESPP Federation of European societies of plant physiology, (Varna, Bulgaria, September 7–11, 1998). — Varna, 1998. — P. 240.
9. *Пустовойтова Т.Н.* Основные направления в изучении влияния засухи на физиологические процессы у растений / Т.Н. Пустовойтова, В.Н. Жолкевич // *Физиол. и биохим. культ. раст.* — 1991. — № 1. — Т. 24. — С. 14–26.
10. *Blackman P.G.* The effects of cytokinins and ABA on stomatal behaviour of maize and *Commelina* / P.G. Blackman, W.J. Davies // *Exp. Bot.* — 1983. — No. 34. — P. 1619–1626.
11. Основи біотехнології рослин: навчальний посібник / В.В. Мацкевич, С.В. Роговський, М.Ю. Власенко, В.М. Черняк. — Біла Церква: БНАУ, 2010. — 156 с.