



## ВПЛИВ СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА РИЗОГЕНЕЗ У РОСЛИН ОСИКИ (*Populus tremula* L.) В УМОВАХ *in vitro*

С.Ю. Білоус, аспірант\*

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Досліджено вплив складу живильного середовища, типу регуляторів росту та тривалості культивування в умовах *in vitro* з метою одержання повноцінних рослин-регенерантів *Populus tremula* L. з розвинутою кореневою системою і придатних для адаптації в умовах теплиці.

**Вступ.** Осика (*Populus tremula* L.) — дерево з родини вербових, поширене по всій Україні. Це один із основних лісотвірних видів, що використовується у багатьох галузях промисловості, біоенергетиці, екологічному ресурсовідновленні та ресурсозбереженні [5].

За даними А.В. Цилюрника існує чотири основні форми осики за кольором кори — зелено-, сіро-, біло- та темногора. Було встановлено, що зеленокора форма є найбільш продуктивною і стійкою проти серцевинної гнилі [7, 8].

Осика відноситься до видів рослин, які важко розмножуються живцями, а насіннєвий спосіб не дає можливості отримувати якісний садивний матеріал. Мікроклональне розмноження рослин є найбільш ефективним і альтернативним вегетативним методом, який не залежить від пори року, дозволяє підвищити якість садивного матеріалу та обсяг виробництва цінних видів і форм осики, забезпечує збереження та оздоровлення

рослинного матеріалу як природного походження, так і отриманого експериментальним шляхом [9].

Завершальним процесом у технології мікроклонального розмноження деревних видів є укорінення, яке відбувається в декілька етапів: індукція, ініціація та поява кореневої системи [2, 4].

Індукторами коренеутворення є деякі типи ауксинів, під впливом яких тканини репрограмуються на меристемний ріст. Фітогормони ауксинового типу неоднаково впливають на різні фізіологічні процеси та на рослини, що належать до різних видів. Найчастіше для укорінення культури пагонів в умовах *in vitro* використовують нафтилоцтову кислоту (НОК) та індолілмасляну кислоту (ІМК) [6].

Мета цього дослідження — вивчення оптимальних строків і впливу гормонального складу живильного середовища на укорінення рослин-регенерантів осики на останніх пасажах перед перенесенням в умови *ex vitro*.

\*Науковий керівник — професор С.Б. Ковалевский.



**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження проводили на базі проблемної лабораторії фітовірусології та біотехнології рослин НУБіП України. Матеріалом для експериментів слугували мікроклональні рослини-регенеранти осики (*Populus tremula* L.) зеленокорої форми. Ця форма викликає особливий інтерес, адже відрізняється швидким ростом, стійкістю до серцевинної гнилі і може використовуватися у біоенергетиці, для створення промислових плантацій, озеленення тощо.

Первинними експлантами слугували апікальні меристеми, вегетативні бруньки та частини пагонів з брунькою. Використовували 1% розчин  $\text{AgNO}_3$  (5–7 хв), 25%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 хв) та одноразово відмивали (5 хв), що дозволило отримати 98% стерильних експлантів. Для нарощування вегетативної маси використовували живильні середовища Мурашіге і Скуга(МС), Драйвера (DKW), Сміта і МакКоуна (WPM) з додаванням регуляторів росту в різних концентраціях: тидіазурон (ТДЗ) ( $0,2\text{--}2,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ), 6-бензиламінопурин (6-БАП) ( $0,5\text{--}2,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ), кінетин ( $0,25\text{--}1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ) [11].

Здатність до укорінення мікророслин, отриманих шляхом живцювання, вивчали на живильних середовищах МС, WPM, DKW з повним або зменшеним удвічі складом макро- і мікроелементів, з додаванням регуляторів росту: ІМК ( $0,5\text{--}2,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ), НОК ( $0,1\text{--}1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ), ТДЗ ( $0,5\text{--}1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ). В основі живильних середовищ використовували мезоінозит  $100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  і 0,7% агар (рН 5,6–5,7). Концентрація сахарози становила  $30 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  і  $15 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ . Процес ініціації коренів проводили як на живильному середовищі з доданням активованого вугілля ( $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ ), так і без нього. Враховували початок утворення коренів, їх кількість, довжину та ріст пагона. Кожен варіант досліду містив 3 повторності по 20 рослин-регенерантів. Експланти культивували при освітленні 3–4 тис. лк, 16-годинному фотоперіоді,  $t = 24 \pm 2^\circ \text{C}$  та 70% вологості повітря [1].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Після накопичення достатньої кількості вегетативної маси наступним етапом було укорінення рослин-регенерантів *Populus tremula* L.

Для укорінення відбирали добре сформовані рослини, що сягали розміру не менше 3 см.

Таблиця. Вплив складу живильного середовища на укорінення *Populus tremula* L.

Середовище	Характеристика ризогенезу			
	Укорінення, %	Кількість коренів, шт.	Довжина коренів, см	Утворення калюсу, %
1. МС + $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК	75	1,6	2,1	5
2. МС + $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК	40	2,3	1,3	20
3. МС + $1,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК	10	1,5	1,2	45
4. МС + $2,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК	0	0	0	0
5. МС + $0,3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК + $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НОК	90	2,8	7,3	0
6. МС + $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ТДЗ + $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ актив. вугілля	95	3,3	8,9	7
7. МС базове	100	6,6	8,2	0
8. $\frac{1}{2}$ . МС базове	100	7,1	8,7	0
9. WPM базове	80	2,1	4,9	0
10. DKW базове	60	1,3	3,6	0

Рослини осики в умовах *in vitro* попередньо готували до укорінення, зменшуючи кількість цитокінінів упродовж останньої (перед укоріненням) стадії розмноження.

Живильні середовища з додаванням синтетичних регуляторів росту ауксинового типу – НОК і ІМК в невеликих концентраціях призводять до формування кореневої системи. Як правило, укорінення мікророслин у культурі *in vitro* відбувається при наявності одного із зазначених вище гормонів. Проте в літературі є дані про те, що використання декількох регуляторів росту ауксинового типу дії в різних комбінаціях значно підвищує інтенсивність ризогенезу [10]. По цій при-

чині, а також для укорінення рослин-регенерантів осики, застосовували одночасно два регулятори росту НОК та ІМК. Також у даному дослідженні було проведено експеримент з додаванням гормону цитокінінного типу дії (ТДЗ), який можна назвати поліфункціональним. ТДЗ у певних концентраціях здатен індукувати різні морфогенні системи, у нашому випадку – коренеутворення (табл., рис.).

Використання ІМК у концентраціях  $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ,  $1,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ,  $2,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  та  $2,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  супроводжувалось незначним укоріненням та утворенням калусу в базальній частині пагона у більшості експлантатів, що є небажаним, оскільки при пересадці рослин у субстрат вони вірогідніше за-

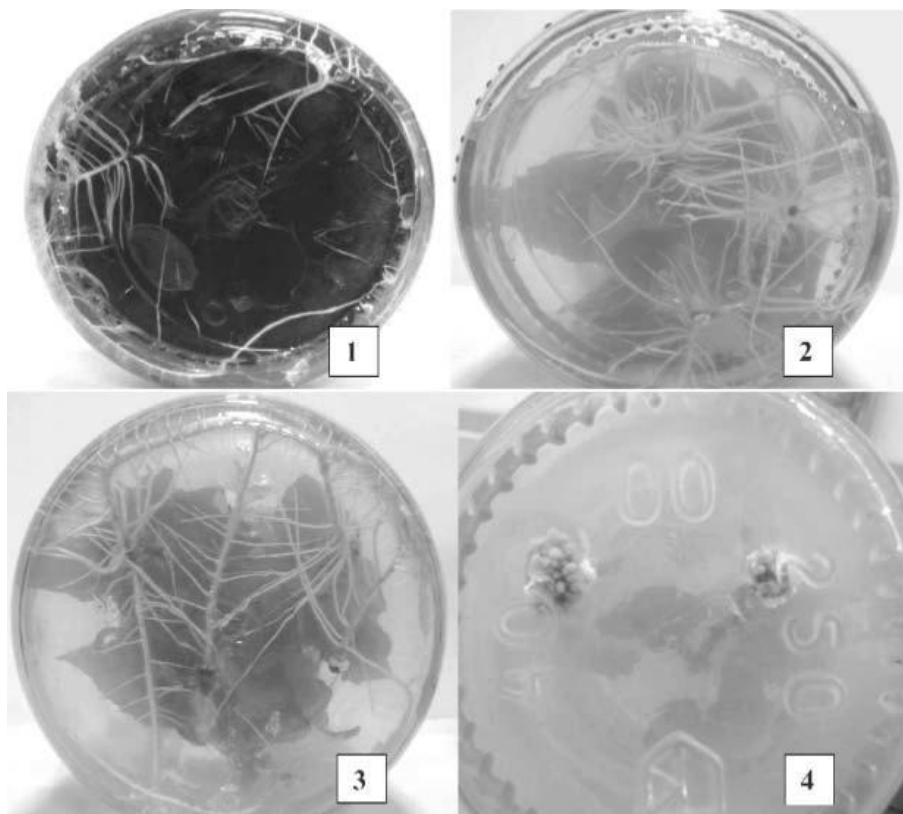


Рис. Вплив складу живильного середовища на ріст та розвиток кореневої системи *Populus tremula L.*: 1 – МС +  $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  ТДЗ +  $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  актив. вугілля; 2 – МС базове; 3 –  $0,5$  МС базове; 4 – МС +  $1,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  ІМК



все загинуть від ботритису та фузаріозу [9]. На середовищі МС + 1,0 мг·л<sup>-1</sup> ІМК у половини рослин відзначали утворення 1–3 корінців розміром 0,7–3 см. Використання МС 0,3 мг·л<sup>-1</sup> ІМК + 0,1 мг·л<sup>-1</sup> НОК стимулювало коренеутворення практично в 90% експлантатів, але інтенсивного розвитку надземної частини рослин не відбувалось, що, можливо, пов'язане із властивістю НОК поглинатися і рухатись по рослинним тканинам.

Застосування ТДЗ (0,5–1,0 мг·л<sup>-1</sup>) та 1 г·л<sup>-1</sup> активованого вугілля на етапі проліферації сприяло самовільному укоріненню рослин-регенерантів вже після 3–4 пасажу. Коренева система складалась з 2–4 коренів та кореневих волосків по всій довжині кореня. Також інтенсивно розвивалась і надземна частина експлантату (збільшувалась кількість міжвузлів, листків та довжина пагона).

Середовище МС (рис.) стимулювало утворення товстих коротких корінців. Зменшення мікроелементів у живильному середовищі МС в ½ рази призводило до укорінення всіх рослин регенерантів

вже на 3–4 добу. Через 7–14 діб утворювалась розвинена коренева система з 4–8 корінцями і довжиною 3–10 см, такі рослини вже можна переводити в умови теплиці.

#### Висновки

Успішне протікання стадії ризогенезу залежить не лише від умов культивування на етапі проліферації, сольового та гормонального складу живильного середовища, а й від загального періоду культивування.

Рослини осики здатні до укорінення на 3 пасажі на середовищі з додаванням активованого вугілля. Зменшення кількості макроелементів на ½ в середовищі МС сприяє швидкому укоріненню рослин, але після 5–6 пасажу.

Оптимальними живильними середовищами для прискореної індукції ризогенезу *Populus tremula* з наступною адаптацією однорідного рослинного матеріалу в умови *ex vitro* виявились: МС + 0,3 мг·л<sup>-1</sup> ІМК + 0,1 мг·л<sup>-1</sup> НОК; МС 0,5 мг·л<sup>-1</sup> ТДЗ + 1 г·л<sup>-1</sup> активованого вугілля; базове МС зі зменшенням удвоє складом макросолей.

#### Література

1. Білоус С.Ю. Вплив мінерального складу живильного середовища і типу цитокініну на морфогенез осики (*Populus tremula* L.) в умовах *in vitro*. "Наукові доповіді НУБіП" 2012-8 (30). - [Електронний ресурс] // Режим доступу: [http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2012\\_1/12bsy.pdf](http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2012_1/12bsy.pdf).
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. — М.: Наука, 1964. — 272 с.
3. Застосування біотехнологічних методів для розмноження гібриду осики і тополі чорної та мікоризації садивного матеріалу / Р.М. Гречаник, О.Ф. Базюк, З.Д. Бондаренко, Л.В. Федяй // Науковий вісник Українського державного лісотехнічного університету. — 2003. — Вип. 13.3. — С. 210–221.
4. Деменко В.И., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г. Укоренение – ключевой этап размножения растений *in vitro* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. — 2010. — №1. — С. 73–85.
5. Особливості мікроклонального розмноження та пряма індукція рослин з листкових експлантів тополь / Кудоконь Н.К., Левенко Б.О., Левчик Н.Я. та ін. // Інтродукція рослин та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках. — К.: Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, 2010. — С. 606–608.
6. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика. — К.: Наук. думка, 2005. — 270 с.



7. Циліорик А. В. Некоторые данные о поражаемости сердцевинной гнилью разных форм осины // Лесоводство и агролесомелиорация. — 1965. — № 2. — С. 128–131.
8. Циліорик А. В. Оздоровлення і вирощування осикових насаджень в Україні. — К.: НВЦ, 1995. — 115 с.
9. Шестибратов К.А., Мирошников А.И. Перспективы использования технологии клонального микроразмножения в лесном хозяйстве ценных генотипов древесных растений // Биотехнология. — Пущино, 2006. — С. 106–111.
10. Ahuja M.R. Aspen. In: Evans DA, Sharp WR and Ammirato PJ (Eds.) Handbook of Plant Cell Culture / Macmillan Publishing Company. — New York, 1986. — P. 626–651.
11. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — 15, №3. — P. 473–497.

#### АННОТАЦІЯ

**Білоус С.Ю.** Влияние состава питательной среды на ризогенез у *Populus tremula* L. в условиях *in vitro* // Биоресурсы и природопользование. — 2012. — 4, № 3–4. — С. 94–98.

Представлены результаты исследований по влиянию состава питательной среды, типа регуляторов роста и продолжительности культивирования в условиях *in vitro* с целью получения полноценных растений-регенерантов *Populus tremula* L. с развитой корневой системой и пригодных для адаптации в условиях теплицы.

#### SUMMARY

**S. Bilous.** Effect of nutrient medium on rhizogenes of *Populus tremula* L. in culture *in vitro* // Biological Resources and Nature Management. — 2012. — 4, № 3–4. — P. 94–98.

The results of research on the impact of the nutrient medium, growth regulators, and duration of cultivation *in vitro* in order to obtain complete plants-regenerants *Populus tremula* L. which developed root system and suitable for adaptation in a greenhouse are presented.