

УДК 57.085.2:582.632.2

ДЛЯ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА РЕГЕНЕРАЦІЙНУ ЗДАТНІСТЬ ЕКСПЛАНТАТІВ РОСЛИН *QUERCUS ROBUR L. IN VITRO*

О. Ю. ЧОРНОБРОВ, кандидат сільськогосподарських наук,
завідувач науково-дослідної лабораторії біотехнології рослин
Відокремлений підрозділ Національного університету біоресурсів
і природокористування України «Боярська лісова дослідна станція»
E-mail: oksana_chornobrov@ukr.net

Розроблення ефективної технології масового тиражування *in vitro* оздоровленого садивного матеріалу цінних лісотвірних деревних рослин, зокрема дуба звичайного (*Quercus robur L.*), є одним із актуальних завдань сьогодення. Вітчизняні та зарубіжні автори зазначають, що одержати стабільно зростаючу культуру *in vitro* з експлантатів деревних рослин родини *Fagaceae Dumort.* досить складно. Метою дослідження було визначення дії регуляторів росту на регенераційну здатність експлантатів рослин *Q. robur in vitro*. Для досліджень використовували зародки із фрагментами ендосперму 120-річних рослин-донорів у січні-лютому 2016 року. Застосовували такі методи дослідження: біотехнологічні (культура тканин рослин *in vitro*, мікроклональне розмноження, калюсна культура), статистичні. Установлено, що ефективна стерилізація (понад 80 %) зародків *Q. robur* досягалася шляхом використання 0,1 % $HgCl_2$ упродовж 15–16 хв. Оптимальні умови для індукції калюсоутворення у тканинах листових пластинок рослин *Q. robur* із частотою понад 90 % та активним ростом створено на живильному середовищі МС (Murasige і Скуга) з 1,0 мг·л⁻¹ БАП (6-бензиламінопурин) і 0,5 мг·л⁻¹ НОК (1-нафтилоцтова кислота) у термостаті без освітлення. Активне мікропагоноутворення у експлантатів рослин *in vitro* зафіксовано на МС із внесенням 1,0 мг·л⁻¹ 2-іП (N-ізопентеніламінопурин) й 20 мг·л⁻¹ аденіну. Подальші дослідження спрямовані на одержання стабільно зростаючої культури *Q. robur in vitro* для масового мікроклонального розмноження.

Ключові слова: *Quercus robur L.*, культура тканин рослин *in vitro*, культура зародків *in vitro*, експлантати, стерилізація, живильне середовище, мікроклональне розмноження, калюс, мікропагоноутворення *in vitro*.

Актуальність. Наразі розроблення ефективної технології масового тиражування оздоровленого садивного матеріалу цінних лісотвірних рослин є одним із актуальних завдань. Ураховуючи надзвичайно важливе значення рослин дуба звичайного (*Quercus robur L.*) для багатьох галузей господарства постає питання щодо розробки технології швидкого розмноження. Альтернативою традиційному розмноженню рослин *Q. robur* є застосування біотех-

нологічних методів, зокрема інструментарію методів культивування тканин рослин *in vitro*, який дозволяє масово одержувати оздоровлені рослини-регенеранти упродовж року, збільшити коефіцієнт розмноження та одержати нові господарсько цінні варіанти і мутанти внаслідок соматичної мінливості [1, 2].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Нині мікроклонування цінних генотипів рослин *Q. robur* проводять у

Польщі (Інститут дендрології Польської академії наук), Білорусії (Інститут лісу НАН Білорусії) та в Україні (ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»). Зокрема, вітчизняними та зарубіжними авторами (Poljakova L. W.; Кулагин Д. В.; Гречанник Р. М. та ін.; Чорнобров О. Ю., Олексійченко Н. О.) проведені дослідження щодо введення в культуру *in vitro* окремих генотипів рослин родини *Fagaceae* Dumort. [3, 5–7, 9]. Однак одержати стабільно ростучу культуру *in vitro* з експлантатів деревних рослин досить складно [1, 2, 5, 6, 9].

Мета дослідження – визначення дії регуляторів росту на регенераційну здатність експлантатів рослин *Q. robur in vitro*.

Матеріали і методи досліджень. Для досліджень використовували зародки із фрагментами ендосперму, які ізолювали у січні-лютому 2016 р. із доброякісних жолудів 120-річних рослин-донорів ранньої форми. Доброякісність жолудів визначали методом розрізування без попереднього замочування у воді за загальноприйнятою методикою [4]. Стерилізацію рослинного матеріалу проводили 0,1 % $HgCl_2$ (5–21 хв) із попередньою обробкою 70 % етиловим спиртом (до 1 хв). Асептичні умови створювали за методами, загальноприйнятими у біотехнології [1, 2]. Зародки вводили в культуру *in vitro* на безгормональне живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [8]. Регенераційну здатність рослинного матеріалу досліджували на МС із додаванням 2,4 - дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д), 1-нафтилоцтової кислоти (НОК), 6- бензиламінопурину (БАП), 6 - фурфуриламінопурину (кінетин) та N-ізопентеніламінопурину (2-іП). До модифікованих живильних середовищ вносили 100 мг-л⁻¹ міо-інозиту, 30 г-л⁻¹ сахарози та 7,0–7,3 г-л⁻¹ агару мікробіологічного. Для нейтралізації вторинних метаболітів у живильне середовище додавали 2 г-л⁻¹

активованого вугілля. Показник кислотності середовища (рН) доводили до рівня 5,7–5,9. Як експлантати для калосоутворення використовували листкові пластинки з асептичних мікропагонів, на яких скальпелем штучно робили насічки. Інтенсивність та частоту калосоутворення у експлантатів фіксували на 30 добу культивування. Рослинний матеріал культивували у світловому приміщенні й термостаті TC-80 без освітлення за температури 25 ± 1 0C і освітлення 2,0–3,0 клк з 16-годинним фотоперіодом та відносною вологістю повітря 70–75 %. Як контроль застосовували безгормональне живильне середовище МС. Статистичне опрацювання експериментальних даних виконували з використанням пакета аналізу MS Excel.

Результати дослідження та їх обговорення. Нині для стерилізації експлантатів деревних рослин автори використовують широкий спектр стерилізуючих речовин ($NaClO$, $AgNO_3$, $HgCl_2$, H_2O_2 , H_2SO_4), однак використання препаратів на основі ртуті найбільш ефективне. Варіанти стерилізації рослинного матеріалу *Q. robur* за використання $HgCl_2$ та отримані результати наведено в таблиці 1.

Установлено, що використання 0,1 % $HgCl_2$ упродовж 5–6 хв не знешкоджує екзогенну мікрофлору зародків (ефективність стерилізації досить низька – $21,2 \pm 2,4$ %). У разі застосування режиму стерилізації № 2 отримали $68,8 \pm 2,4$ % асептичного життєздатного рослинного матеріалу. Значний відсоток ефективності стерилізації зародків (понад 80 %) фіксували за використання 0,1 % $HgCl_2$ упродовж 15–16 хв. Витримування його понад 20 хв не доцільне, оскільки переважна більшість зародків не були життєздатними.

Після одержання стерильного життєздатного рослинного матеріалу (рис. 1, а) на безгормональному МС його нарізали на фрагменти та переносили на МС із додаванням 0,25 мг-л⁻¹ кінетину (рис. 1, б).

1. Ефективність стерилізації зародків рослин *Q. robur in vitro*

Варіант	Режим стерилізації зародків	Ефективність стерилізації зародків (середнє значення ± стандартна помилка), %
1	0,1 % HgCl ₂ упродовж 5–6 хв	21,2 ± 2,4
2	0,1 % HgCl ₂ протягом 12–13 хв	68,8 ± 2,4
3	0,1 % HgCl ₂ упродовж 15–16 хв	82,5 ± 4,8
4	0,1 % HgCl ₂ протягом 20–21 хв	12,5 ± 3,2

Таке субкультивування (на 10 добу) індукувало потовщення основи стебла з наступним (на 20 добу) утворенням калюсу твердої консистенції світло-салатової пігментації (рис. 1, в). Для одержання стабільно ростучої культури *Q. robur in vitro*, як показали результати досліджень, досить ефективним було чергування безгормонального живильного середовища (МС з 2,0 г·л⁻¹ активованого вугілля) із гормональним (МС з 0,25 мг·л⁻¹ кінетину або 0,5 мг·л⁻¹ БАП) за циклу культивування 5–7 діб.

За таких умов одержали активно ростучі мікропагони завдовжки 1,5–2,5 см (рис. 1, г).

Регенераційна здатність експлантатів деревних рослин, зокрема інтенсивність їх переходу із диференційованого стану до дедиференційованого та активної проліферації зумовлена генотипом, складом живильного середовища, типом експлантату та умовами культивування. Результати дії гормональних та фізичних чинників на інтенсивність калосоутворення у експлантатів зазначено у таблиці 2.

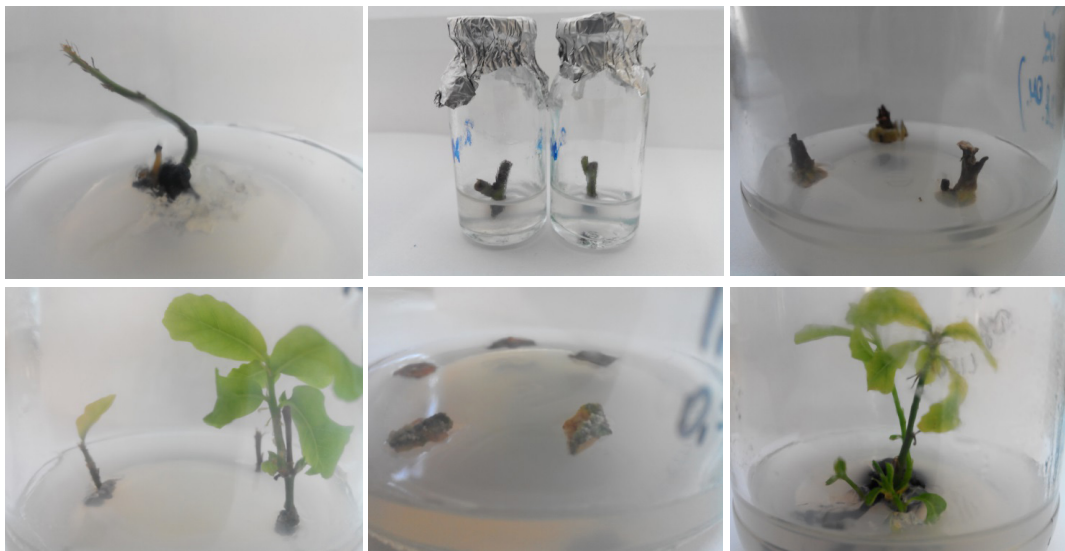


Рис. 1. Результати дії регуляторів росту рослин на регенераційну здатність експлантатів *Q. robur in vitro*: а – асептичні життєздатні експлантати, одержані зі стерильних зародків, 15-доба культивування; б – мікропагони *Q. robur* на МС з 0,25 мг·л⁻¹ кінетину; в – калюсна тканина при основі експлантату, 20 доба культивування; г – мікропагони рослин, одержані шляхом активації росту наявних меристем експлантатів на МС з 0,5 мг·л⁻¹ БАП; д – калюсна тканина твердої консистенції на МС з 1,0 мг·л⁻¹ БАП і 0,5 мг·л⁻¹ НОК; е – активне мікропагоноутворення шляхом прямого морфогенезу на МС із 1,0 мг·л⁻¹ 2-іП й 20 мг·л⁻¹ аденіну у світловому приміщенні за контрольованих умов.

2. Дія регуляторів росту й умов культивування на індукцію калусоутворення у експлантатів рослин *Q. robur*, 30 діб у культурі *in vitro*

Варіант	Склад живильного середовища	Умови культивування			
		світлове приміщення (2,0–3,0 клк)		термостат (без освітлення)	
		частота калусоутворення (середнє значення ± стандартна помилка), %	інтенсивність калусоутворення ²	частота калусоутворення (середнє значення ± стандартна помилка), %	інтенсивність калусоутворення ²
К ¹	МС безгормональне	–	–	–	–
1	МС з 1,0 мг·л ⁻¹ БАП і 0,5 мг·л ⁻¹ НОК	50,0 ± 4,1	++	92,5 ± 4,8	+++
2	МС з 2,0 мг·л ⁻¹ 2,4-Д	0	–	0	–

Примітки:

1) контроль; 2) інтенсивність калусоутворення: (–) – відсутність калусоутворення, (+) – низька, (++) – середня, (+++) – активна

Початок калусоутворення у листових пластинок рослин *Q. robur* фіксували у місцях насічок зміною пігментації з наступною їх деформацією на 10 добу культивування. Досить високу частоту калусоутворення експлантатів (понад 90 %) з наступною активною проліферацією тканини одержали на живильному середовищі МС з 1,0 мг·л⁻¹ БАП і 0,5 мг·л⁻¹ НОК за умови культивування в термостаті без освітлення (рис. 1, д). У разі витримування листових пластинок на аналогічному середовищі за освітлення 2,0–3,0 клк частота калусоутворення значно знижувалася. Вплив режиму освітлення на частоту калусоутворення експлантатів є статистично значущим при $\alpha = 0,05$ (Грозрах. > Fкрит., Грозрах. = 45,63, Fкрит. = 5,99). На 30 добу культивування одержали активно ростучий калус твердої консистенції різної пігментації: салативий у термостаті без освітлення та

темно-зелений із осередками світло-салатового за освітлення. Витримування рослинного матеріалу на 2,0 мг·л⁻¹ 2,4-Д як за освітлення, так і за його відсутності є, недоцільним, оскільки процес калусоутворення не відбувався.

Морфометричні параметри мікропагонів за дії регуляторів росту цитокінінового типу відображено у таблиці 3.

Мікропагони рослин *Q. robur* мікроклонально розмножені за використання активної росту меристем експлантата й прямого морфогенезу. Досить активне мікропагоноутворення у експлантатів *in vitro* з одночасним потовщенням основи зафіксовано на МС із внесенням 1,0 мг·л⁻¹ 2-іП та 20 мг·л⁻¹ аденіну (рис. 1, е). Використання варіантів модифікованого живильного середовища із кінетином і БАП (варіанти 2, 3, 4) індукувало розвиток мікропагонів шляхом активації росту меристем експлантатів. На запропонова-

3. Характеристики росту мікропагонів *Q. robur* за культивування на модифікованих живильних середовищах МС, 60 діб у культурі *in vitro*

Варіант	Склад живильного середовища	Довжина мікропагона (середнє значення ± стандартна помилка), см	Кількість мікропагон./експл. (середнє значення ± стандартна помилка), шт.	Пігментація	Тип морфогенезу	Наявність кореневої системи	Примітки
К ¹	б/г	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	світло-салатова	а.р.н.м.е.2	–	–
1	1,0 мг·л ⁻¹ 2-іП + 20 г·л ⁻¹ аденіну	2,6 ± 0,4	5,0 ± 0,4	зелена	прямий морфогенез	–	потовщення основи стебла
2	0,5 мг·л ⁻¹ БАП й кінетину	2,1 ± 0,4	1,8 ± 0,3	-//-	а.р.н.м.е.2	–	-//-
3	3,0 мг·л ⁻¹ БАП	2,0 ± 0,2	1,5 ± 0,3	світло-салатова	а.р.н.м.е.2	–	–
4	5,0 мг·л ⁻¹ БАП	2,1 ± 0,3	1,2 ± 0,3	-//-	а.р.н.м.е.2	–	–

Примітки:

1) контроль – безгормональне живильне середовище; 2) активація росту наявних меристем експлантату

них живильних середовищах на 60-добу культивування довжина мікропагона становила 1–3 см; наявність кореневої системи не фіксували.

Отже, в результаті проведених досліджень нами досліджена регенераційна здатність тканин рослин *Q. robur in vitro* за дії регуляторів росту.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Ефективна стерилізація (понад 80 %) зародків *Q. robur*, одержаних у січні-лютому із 120-річних рослин-донорів, досягалася шляхом використання 0,1 % HgCl₂ упродовж 15–16 хв. На етапі введення в культуру *in vitro* рослинного матеріалу *Q. robur* необхідно проводити чергування безгормонального живильного середовища (МС із 2,0 г·л⁻¹ активованого вугілля) з гормональним (МС з 0,25 мг·л⁻¹ кінетину або

0,5 мг·л⁻¹ БАП) за циклу культивування 5–7 діб. Досліджено дію регуляторів росту ауксинового та цитокінінового типів дії на регенераційну здатність тканин рослин *Q. robur in vitro*. Оптимальні умови для індукції калусоутворення у тканинах листкових пластинок рослин *Q. robur* із частотою понад 90 % та активним ростом створено на живильному середовищі МС із 1,0 мг·л⁻¹ БАП і 0,5 мг·л⁻¹ НОК у термостаті без освітлення. Активне мікропагоноутворення у експлантатів рослин *Q. robur in vitro* зафіксовано на МС із внесенням 1,0 мг·л⁻¹ 2-іП й 20 мг·л⁻¹ аденіну. Подальші дослідження спрямовані на одержання стабільно зростаючих культур *Q. robur in vitro* на модифікованих живильних середовищах для масового мікроклонального розмноження.

Література

1. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений: учеб. пособ. / Р. Г. Бутенко – М.: Наука. – 1964. – 272 с.
2. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. – К. : Наукова думка, 1980. – 488 с.
3. Кулагин Д. В. Получение и индивидуальные особенности культур *in vitro* дуба черешчатого / Д. В. Кулагин // Сборник научных трудов [Институт леса Национальной академии наук Беларуси]. – Гомель, 2012. – Вып. 72. – Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 232–240.
4. Насіння дерев і кущів. Методи визначення посівних якостей (схожості, життєздатності, доброякісності) : ДСТУ 8558 : 2015. – [Чинний від 2017-01-01]. – К.: Держспоживчстандарт 2017. – 91 с. – (Національний стандарт України).
5. Патент 68765 Україна, МПК (2012.01) A01H 4/00. Спосіб розмноження *in vitro* плюсових дерев бука лісового (*Fagus silvatica* L.) / Гречаник Р. М., Гузь М.М., Лісовий М.М.; власник Державний вищий навчальний заклад «Національний лісотехнічний університет України». – № у 2011 11325; подано 26.09.2011; опубл. 10.04.2012, Бюл. № 7.
6. Чорнобров О. Ю. Особливості введення в культуру *in vitro* рослини Бука лісового (*Fagus silvatica* L.) / О.Ю. Чорнобров, Н.О. Олексійченко // Лісове і садово-паркове господарство. – 2014. – № 5. – Режим доступу до журн. <http://ejournal.studnubip.com/zhurnal-5/ukr/>
7. Chalupa V. *In vitro* Propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.) // Biol. Plant., 1984. – Vol. 26, № 5. – P. 374–377.
8. Murashige T. A Revised Medium for Rapid, Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plantarum*. – 1962. – Vol.15, N. 3. – P. 473.
9. Poljakova L.W. Biochemical Marker of the Oak Leaves (*Quercus robur* L.) on Resistant to *Microspora Amphitoides* Grif. Et Suitable for Microclonal Propagation of 1–3 Year Old Seedlings / Poljakova L.W. // *Biotechnology Approaches for Exploitation and Preservation of Plant Resources*. – Yalta, 2002. – P. 15.

References

1. Butenko, R.G. (1964). *Kultura izolirovanykh tkaney i fiziologiya morfogeneza rasteniy* [Culture of Isolated Tissues and Physiology of Plant Morphogenesis]. Moscow, Russia: Science, 272.
2. Kalinin, F. L., Sarnatskaya V.V., Polishchuk V.E. (1980). *Metody kultury tkaney v fiziologii i biokhimiі rasteniy* [Methods of Tissue Culture in Plant Physiology and Biochemistry]. Kiev:Naukova dumka, 488.
3. Kulagin, D.B. (2012). *Poluchenie i individualnye osobennosti kultur in vitro duba chereschatoho* [Obtaining and Individual Features of English oak *in vitro* Cultures]. Collection of scientific works of Forest Institute of National Academy of Sciences of Belarus. Belarus (Homel), 72, 232–240.
4. *Seeds of Trees and Shrubs. The Methods of Determining the Sowing Qualities (Similarity, Viability, Benign)* (2017) [Nasinnia derev i kushchiv. Metody vyznachennia posivnykh yakosteі (skhozhosti, zhyttiezdatnosti, dobroiakisnosti)]. State Standard of Ukraine. Effective from 2017-01-01. Kiev, 91.
5. Hrechanyk, R. M., Huz, M.M., Lisoviі M.M., (2012). *The Method of in vitro Propagation of European beech (Fagus silvatica L.) Valuable Trees. Patent of Ukraine for useful model. A01H 4/00. № 68765; declared 26.09.2011; published 10.04.2012, № 7.*
6. Chornobrov, O.Yu., Oleksiichenko, N.O. (2014). *Osoblyvosti vvedennia v kulturu in vitro roslin Buka lisovoho (Fagus silvatica L.)* [Peculiarities of Beech (*Fagus silvatica* L.) Plants Introduction to *in vitro* Culture]. *Forestry and Horticulture*, 5, <http://ejournal.studnubip.com/zhurnal-5/ukr/>
7. Chalupa, V. (1984). *In vitro Propagation of Oak (Quercus robur L.) and Linden (Tilia cordata Mill.)*. *Biol. Plant.*, 26 (5), 374–377.
8. Murashige, T. A., Skoog F. (1962). *Revised Medium for Rapid, Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures*. *Physiol. Plantarum*, 15 (3), 473.
9. Poljakova, L.W. (2002). *Biochemical Marker of the Oak Leaves (Quercus robur L.) on Resistant to Microspora Amphitoides Grif. Et Suitable for Microclonal Propagation of 1–3 Year Old Seedlings*. *Biotechnology Approaches for Exploitation and Preservation of Plant Resources*, 15.

SUMMARY

O. Yu. Chornobrov Effect of growth regulators on *in vitro* regenerative ability of explants of *quercus robur* L. / *Biological Resources and Nature Management*. – 2017. – 9, №3–4. – P.13–19.

Development of efficient *in vitro* mass production technology of uninfected planting material of valuable forest-forming woody plants, including English oak (*Quercus robur* L.), is one of the urgent tasks of today. Domestic and foreign authors note that getting stably growing *in vitro* culture explants of woody plants of the family *Fagaceae* Dumort. is quite difficult. The purpose of the research was to determine the effect of growth regulators on *in vitro* regenerative ability of *Q. robur* explants. For the studies that were carried in January and February 2016, the embryos with fragments of the endosperm of 120-year-old donor plant were used. The following study methods were exploited: biotechnological (plant tissue culture *in vitro*, microclonal propagation, callus culture), statistical. It was established that the effective sterilization (above 80 %) of *Q. robur* embryos was achieved through the use of 0.1 % $HgCl_2$ within 15–16 minutes. The optimal conditions for induction of callus formation in leaf blade tissues of plants *Q. robur* with a frequency of more than 90 % and active growth were received on MS medium (T. Murashige & F. Skoog) with the addition of 1.0 mg·L⁻¹ BAP (6-Benzyladenine) and 0.5 mg·L⁻¹ NAA (1-Naphthylacetic acid) in an incubator and without light. An active shoots formation in plant explants *in vitro* was fixed on MS medium modified with 1.0 mg·L⁻¹ 2-iP (6-(γ,γ -Dimethylallylamino) purine) and 20 mg·L⁻¹ of adenine. Further studies are aimed at obtaining stably growing *in vitro* cultures of *Q. robur* for mass microclonal propagation.

Keywords: *Quercus robur* L., plant tissue culture *in vitro*, embryo culture *in vitro*, explants, sterilization, culture medium, microclonal propagation, callus, shoots *in vitro*.

АННОТАЦІЯ

О. Ю. Чорнобров Действие регуляторов роста на регенерационную способность эксплантатов растений *quercus robur* L. *In vitro* // Биоресурсы и природопользование. – 2017. – 9, №3–4. – С.13–19.

На данный момент разработка технологии массового тиражирования *in vitro* оздоровленного посадочного материала ценных лесобразующих древесных растений, в частности дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), чрезвычайно актуальна. Отечественные и зарубежные авторы отмечают, что получить стабильно растущую культуру *in vitro* с эксплантатов древесных растений семейства *Fagaceae* Dumort. достаточно сложно. Целью исследования было определение действия регуляторов роста на регенерационную способность эксплантатов растений *Q. robur in vitro*. Для исследований использовали зародыши с фрагментами эндосперма 120-летних растений-доноров в январе-феврале 2016 г. Применяли следующие методы исследования: биотехнологические (культура тканей растений *in vitro*, микроклональное размножение, каллусная культура), статистические. Установлено, что эффективная стерилизация (более 80 %) зародышей *Q. robur* достигалась путем их выдерживания у 0,1 % $HgCl_2$ в течение 15-16 мин. Оптимальные условия для индукции каллусообразования в тканях листовых пластинок растений *Q. robur* с частотой более 90 % и активным ростом создано на питательной среде МС (Мурасиге и Скоуга) с 1,0 мг·л⁻¹ БАП (6-бензиламинопурина) и 0,5 мг·л⁻¹ НОК (1-нафтилуксусная кислота) в термостате без освещения. Активное микроклональное размножение эксплантатов растений *in vitro* зафиксировано на МС с внесением с 1,0 мг·л⁻¹ 2-иП (N-изопентениламинопурина) и 20 мг·л⁻¹ аденина. Получены микробеги растений путем активации роста имеющихся меристем эксплантата и прямого морфогенеза. Дальнейшие исследования направлены на получение стабильно растущей культуры *Q. robur in vitro* для массового микроклонального размножения.

Ключевые слова: *Quercus robur* L., культура тканей растений *in vitro*, культура зародышей *in vitro*, эксплантаты, стерилизация, питательная среда, микроклональное размножение, каллус, микробеги *in vitro*.