

## БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ РОЗМНОЖЕННЯ ВЕЛИКОВІКОВОГО ДЕРЕВА ДУБА МАКСИМА ЗАЛІЗНЯКА В УМОВАХ *IN VITRO*

*С.Ю. Білоус, аспірантка\**

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

*Досліджено особливості мікроклонального розмноження дуба Максима Залізняка в умовах *in vitro*, а саме: підбір способу стерилізації рослинного матеріалу, модифікація живильних середовищ з метою одержання повноцінних рослин-регенерантів з розвинутою кореневою системою. Здійснено адаптацію отриманих клонів багатовікового дуба до умов *in vivo*.*

**Ключові слова:** *дуб Максима Залізняка, мікроклональне розмноження, експлантат, живильне середовище, морфогенез, *in vitro*.*

Надзвичайно цінною пам'яткою української природи та своєрідним культурним надбанням є унікальний екземпляр виду *Quercus robur* L. дуб Максима Залізняка. На даний час він потребує підвищеної уваги наукової спільноти стосовно його збереження та лікування [4].

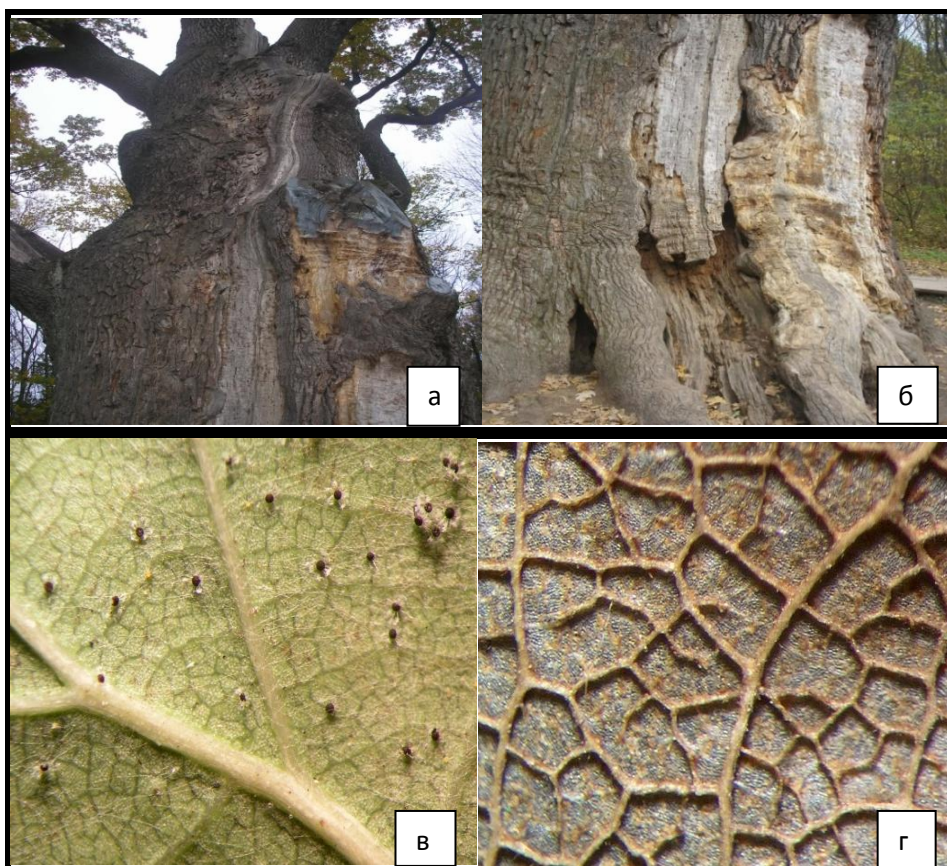
Історично-цінне багатовікове дерево знаходиться поблизу хутора Буда Чигиринського району Черкаської області. Це – одне з найстаріших і наймогутніших дерев віком понад 1000 років, заввишки 30 метрів і обхватом стовбура 9 метрів, яке не лише належить до головних лісотвірних видів Холодноярських лісів, а, й слугує історичною пам'яткою та становить великий інтерес як для туристів, так і для науковців.

Ззовні здається, що загальний стан дерева задовільний, адже у нього добре розвинута крона, періодично спостерігаються цвітіння та плодоношення. Проте все ж дуб має численні пошкодження: у нижній частині стовбура є дупло, у кроні – окремі сухі гілки, сама ж крона закріплена спеціальною системою

---

\* Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук, професор С.Б. Ковалевський

канатів «Кобра», листя пошкоджено шкідниками, у дерево кілька разів потрапила блискавка та й вік являє собою досить несприятливий фактор стосовно життєздатності дерева (рис. 1).



**Рис. 1. Пошкодження стовбура та листків багатовікового дерева дуба Максима Залізняка:**

**а** – місце на стовбурі дерева, куди потрапила блискавка, **б** – стовбур багатовікового дуба, пошкоджений шкідниками, **в** – міцелій та клейстотеції на поверхні листя дуба Максима Залізняка (борошниста роса дуба), **г** – локальне пошкодження листка дерева, фітофагом.

Слід зазначити, що вегетативне розмноження деревних видів тривалий і трудомісткий процес, а для деяких дерев таке розмноження взагалі неможливе. Разом із тим, досягнення в області культури клітин і тканин привели до створення принципово нового методу вегетативного розмноження – мікроклонального. В його основі знаходиться унікальна здатність рослинної клітини реалізовувати властиву їй тотипотентність, тобто під впливом екзогенних дій започатковувати рослинний організм [8, 9].

**Мета дослідження.** Розробити технології мікроклонального розмноження багатовікового історично-цінного дерева дуба Максима Залізняка в цілях практичного використання для збереження культурної пам'ятки природи.

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження виконувалися на базі проблемної лабораторії фітовірусології та біотехнології рослин НУБіП України. Матеріалом для їх проведення, слугували пагони багатовікового дерева – дуба Максима Залізняка. У цих дослідженнях як вихідний матеріал використовували пагони з бічними і апікальними бруньками, просто бруньки, листки та штучно пробуджені бруньки.

При виділенні меристем бруньки очищали від покривних лусок, потім промивали у розчині миючого засобу з дистильованою водою протягом 25 хв. Стерилізуючими агентами були: комерційний препарат „Domestos” (концентрація 1:1), нітрат срібла (1 %-й р-н  $\text{AgNO}_3$ ) і перекис водню (25-50 %-й р-н  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Концентрації та експозиції стерилізацій визначали експериментально, спираючись на загальноприйняті методи [5]. Після стерилізації застосовували триразове відмивання в стерильній дистильованій воді, практикували також стерилізацію без відмивання.

На етапі введення в культуру *in vitro* та регенерації використовували живильні середовища Мурасіге і Скуга (МС), Сміта і МакКоуна та Халупи з додаванням вітамінів і фітогормонів 6-бензиламінопурину (6-БАП), тидіазурону (ТДЗ), 6-фурфуриламінопурину (кінетин), гіберелової кислоти (ГК),  $\alpha$ -нафтилоцтову кислоту (НОК), індоліл-3-масляної кислоти (ІМК) різної концентрації. Експлантати вирощували в культуральній кімнаті при освітленні люмінесцентними лампами 3-4 тис. лк,  $t = 24 \pm 2^\circ\text{C}$  із вологістю повітря 70% та 16-годинним фотоперіодом [1].

Для індукції ризогенезу відбирали рослини, що сягали розміру не менше 2 см та мали добре сформовані листки. Попередньо їх занурювали у розчин із  $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  ІМК на 6 хв [6, 8]. Такий захід сприяв швидшому коренеутворенню в культурі *in vitro*. Рослини переносили на середовище МС та Халупи зі зменшеним уполовину вмістом мінеральних сполук і сахарози та різною концентрацією ( $0,1-1,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ) ауксинів (ІМК і НОК). Використовували середовища для укорінення як з додаванням активованого вугілля у середовищі МС, так і без нього у середовищі Халупи.

Рослини-регенеранти, які мали добре сформовані пагони не менше 2–2,5 см із 3–6 листками та кореневу систему 3–5 см, адаптовували до умов *in vivo*. Адаптацію проводили поступово. Спочатку рослини упродовж тижня знаходилися в стерильній ґрунтовій суміші в накритому стані за умов високої вологості 90-100 % та температури  $22\pm 1^\circ\text{C}$ . Через тиждень їх відкривали один раз на день, починаючи з 10-15 хв, поступово збільшуючи період перебування клонів у відкритому стані при звичайних тепличних умовах.

Для адаптації використовували різні субстрати (торф, пісок, дерновий ґрунт) та їх суміші. Суміш для адаптації рослин-регенерантів готували заздалегідь.

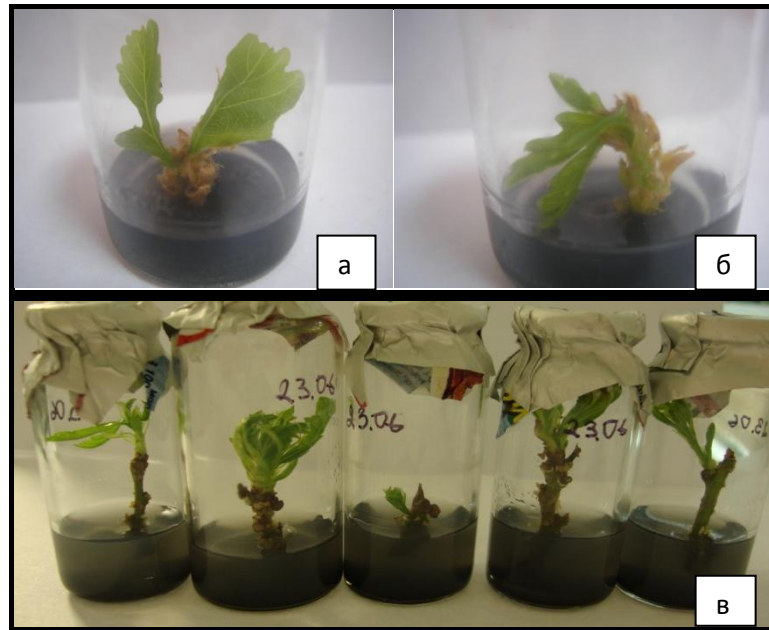
Беручи до уваги досить великий спектр можливого впливу вторинних метаболітів на особливості розвитку експлантатів при мікроклональному розмноженні багатовікового дуба, проводили дослідження з визначення вмісту загальних фенолів за методом Левенталя в модифікації А.Л. Курсанова (1937), неодноразово апробований іншими дослідниками фенольних сполук. Для порівняння брали листя з молодого дерева дуба звичайного 10–15 років та багатовікового дерева дуба звичайного – дуба Максима Залізняка [10].

Першим етапом будь-яких біотехнологічних досліджень, пов'язаних з культурою тканини рослин, є отримання стерильно чистої рослинної сировини [8, 11].

**Результати дослідження.** Правильний добір стерилізуючої речовини полягає в тому, щоб вона вбивала патогенну мікрофлору і якомога менше шкодила рослинним тканинам.

Враховуючи те, що пагони багатовікового дерева, ендогенно пошкоджені грибами та бактеріями, в усіх випадках використовували складні стерилізації компонуєчи різні стерилізанти. Виникали труднощі у стерилізації об'єктів з тріщинами, заглибинами, пошкодженнями. У цьому випадку не лише поверхнева стерилізація, а й проникання всередину стерилізуючого розчину негативно впливало на ріст тканини в умовах *in vitro*.

Досліджено, що стерилізація: 70 %-й спирт – 30 сек, 1 %-й  $\text{AgNO}_3$  – 10 хв, одноразове відмивання (1хв), 50 %-й р-н  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 10 хв, одноразове відмивання (5 хв) забезпечує одержання 90 % асептичних життєздатних експлантатів з дерева дуба Максима Залізняка, на яких через 9–14 днів на середовищі  $\frac{1}{2}$  макро МС з додаванням  $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  БАП спостерігали активацію пазушних бруньок (рис. 2) [3, 4].



**Рис. 2. Проростання асептичних експлантатів Дуба Максима Залізняка на 9-14 добу в культурі *in vitro*:**

**а, б** – активація меристем апікальної бруньки, **в** – пробудження апікальних та латеральних бруньок безпосередньо на експлантатах.

Для забезпечення високого коефіцієнта регенерації в культурі *in vitro* доцільніше використовувати ювенільний матеріал. В результаті експерименту найпридатнішим первинним матеріалом для введення в культуру *in vitro* виявилися штучно пробуджені бруньки дуба Максима Залізняка. Вони дуже добре піддавалися стерилізації та характеризувалися значним морфогенним потенціалом.

Утворення рослин відбувалося під дією регуляторів росту, які додавалися до живильного середовища МС, Сміта і МакКоуна та Халупи. Позитивні результати отримано лише в окремих випадках, що свідчить про різне перепрограмування механізмів розвитку клітинами експлантата [4].

Найактивніший ріст пагонів спостерігали на середовищі МС та Халуپی з додаванням  $0,5\text{--}2,0\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  БАП. Встановлено, що низькі концентрації 6-БАП стимулювали швидкий ріст коротких пагонів, які через місяць сягали 2–3 см. На середовищі Халуپی з додаванням  $2,0\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  6-БАП експлантати утворювали невелику кількість інтенсивно ростучих рослин. На середовищі Смітта і МакКоуна з додаванням  $1,0\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  БАП рослини-регенеранти не проявляли себе у рості.

Найвагоміші результати отримано на середовищі МС з додаванням БАП  $1,0\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  і ГК  $0,5\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ , на якому пагони сягали довжини 2–4 см (рис. 3).

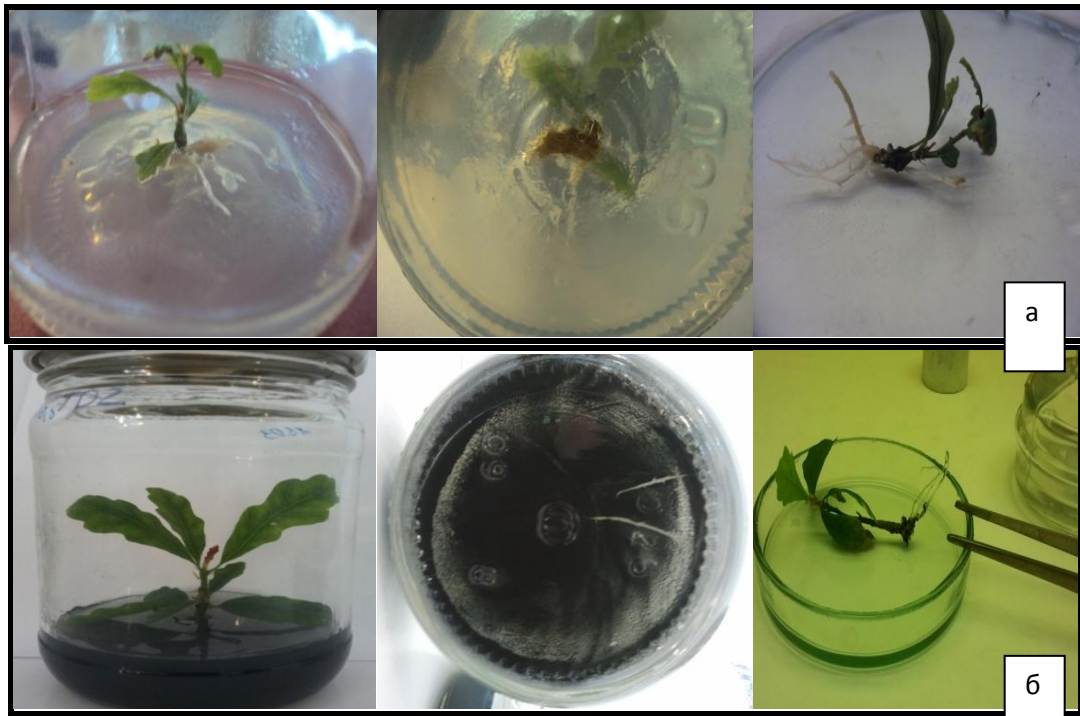


**Рис. 3. Утворення мікропагонів на експлантаті дуба Максима Залізняка в умовах *in vitro*.**

Отримані мікропагони переносили на свіжі живильні середовища збільшуючи кількість клонованих рослин з кожною новою пересадкою. Після накопичення достатньої кількості вегетативної маси наступним етапом було укорінення рослин-регенерантів дуба Максима Залізняка.

Ініціацію ризогенезу відзначали на 10–14 день. Спочатку встановили формування основного кореня, потім бічних. Формування розвинутої кореневої системи спостерігали на 20–30 добу [2, 7].

За результатами досліджень, найпридатнішим середовищем для укорінення виявилось МС  $0,3\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  ІМК +  $0,1\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  НОК з додаванням активованого вугілля  $1\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  та середовище Халуپی з додаванням  $1,5\text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  ІМК без активованого вугілля (рис. 4).



**Рис. 4. Ініціація коренеутворення на експлантатах дуба Максима Залізняка на різних живильних середовищах:**

**а** – живильне середовище Халупи ( $1,5 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$  ІМК), **б** – живильне середовище Мурасіге і Скуга ( $0,3 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$  ІМК +  $0,1 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$  НОК +  $1 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$  активованого вугілля).

Визначено, що вміст загальних фенолів за методом Левенталя для багатовікового дерева дуба Максима Залізняка, становив  $54,08 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$ , тоді як у дуба 10–15 років ці показники були значно меншими ( $37,4 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$ ). Таким чином було ще раз підтверджено те, що з роками рослини накопичують фенольні сполук, які здатні проявляти інгібуючий вплив на ріст і розвиток рослин у культурі *in vitro*.

За результатами досліджень приживлюваність рослин-регенерантів у період їх адаптації до субстрату в умовах закритого ґрунту на субстраті торф : пісок : дерновий ґрунт (1:1:1) становила 40 %. Це найвагоміший результат серед усіх варіантів субстрату, що використовувалися (рис. 5).

**Висновки.** Приживлюваність рослин-регенерантів у період їх адаптації до субстрату, який складався із торфу, піску і дернового ґрунту у співвідношенні 1:1:1, в умовах закритого ґрунту становила 40 %.



**Рис. 5. Поступова адаптація рослини-регенеранта багатовікового дерева дуба Максима Залізняка.**

Загалом, одержані результати досліджень можуть бути застосовані для мікроклонального розмноження історично-цінних великовікових дерев з урахуванням особливостей кожного виду, але подальші дослідження необхідні для підвищення ефективності цієї технології.

### **Список літератури**

1. Білоус С.Ю. Особливості морфогенезу Дуба Максима Залізняка в культурі *in vitro* / С.Ю. Білоус, Ю.В. Коломієць // матеріали IV Всеукр. конф. молодих учених: Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва (Сколе, 1-4 червня, 2010 р.) НААНУ, Інститут агроекології / Сколе : Інститут агроекології, 2010. – С. 286–289.
2. Білоус С.Ю. Укорінення рослин-регенерантів Дуба Максима Залізняка *in vitro* / С.Ю. Білоус, Ю.В. Коломієць // матеріали VI Міжнар. наук. конференції студентів і аспірантів : Молодь і поступ біології (Львів, 21-24 вересня 2010 року). – Львів, 2010. – С. 68–69.
3. Білоус С.Ю. Одержання стерильної культури Дуба Максима Залізняка (*Quercus robur* L.) / С.Ю. Білоус, Ю.В. Коломієць // матеріали VII Всеукр. наук. конференції студентів, магістрів та аспірантів : Сучасні проблеми екології та геотехнологій (Житомир, 24–26 березня 2010 року). – Житомир : ЖДТУ, 2010. – С. 75–76.
4. Білоус С.Ю. Біотехнологічні аспекти введення в культуру *in vitro* Дуба Максима Залізняка / С.Ю. Білоус, Ю.В. Коломієць // матеріали міжнар. наук.



конференції до 75-річчя Національного ботанічного саду ім. Гришка НАН України : Інтродукція рослин та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках (Київ, 15-17 вересня 2010 р.). – К., 2010. – С. 583–585.

5. Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* / Р.Г. Бутенко. – Пушино : Пушин НЦ, 1994. – С. 7–26.

6. Бутова Г.П. Морфогенез и регенерация растений дуба черешчатого в культуре *in vitro* / Г.П. Бутова, Л.Л. Скробова // Физиология растений. – 1988. – Т. 35, № 5. – С. 1023–1030.

7. Коломиец Ю.В. Регенерация растений Дуба Максима Залезняка *in vitro* / Ю.В. Коломиец, С.Ю. Белоус // материалы междунар. науч.-практ. конф., посвященной 80-летию Института леса НАН Беларуси (Гомель, 17-19 ноября, 2010 г.) / Институт леса НАН Беларуси; ред.-колегия: А.И. Ковалевич [и др.] – Гомель : Институт леса НАН Беларуси, 2010. – С. 196–197.

8. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К. : Наук. думка, 2005. – 270 с.

9. Марчук О.О. Збереження та розмноження цінних генотипів *in vitro* / О.О. Марчук, В.І. Кирилюк // Наукові доповіді НАУ. – 2008–4 (12) – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.nbu.gov.ua/e-journals/nd/2008-4/08moogiv.pdf>.

10. Федорова А.И. Практикум по экологии и охране окружающей среды. Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Федорова, А.Н. Никольская – М. : Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2001. – 288 с.

11. Chalupa V. *In vitro* propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.) / V.Chalupa. Biol. Plant. – 1984. – № 26(5). – P. 374–377.

*Исследованы особенности микроклонального размножения дуба Максима Залезняка in vitro, а именно: подбор способа стерилизации растительного материала и модификация питательных сред с целью получения полноценных растений-регенерантов с развитой корневой системой. Осуществлена адаптация полученных клонов многовекового дуба к условиям in vivo.*

**Ключевые слова:** дуб Максима Зализняка, микроклональное размножение, эксплантат, питательная среда, морфогенез, *in vitro*.

*The features of microclonal propagation of oak Maksim Zaliznak in the in vitro culture, which consisted from sterilization of plant materials and modifications of nutrient mediums to get plant regenerants with developed root system, were researched. The adaptation of clones from centuries-old oak Maksim Zaliznak to in vivo conditions was done.*

**Key words:** Oak Maksim Zaliznak, micropropagation, explant, nutrient medium, morphogenesis, *in vitro*.