

**ОСОБЛИВОСТІ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*  
РОСЛИН БУКА ЛІСОВОГО (*FAGUS SILVATICA L.*)**

***О.Ю. Чорнобров, кандидат сільськогосподарських наук  
ВП НУБіП України «Боярська лісова дослідна станція»***

***Н.О. Олексійченко, доктор сільськогосподарських наук, професор  
Національний університет біоресурсів і природокористування України***

*Розроблено методичні підходи щодо отримання асептичних життєздатних експлантатів рослин бука лісового (*Fagus sylvatica L.*). Підібрано оптимальний склад живильного середовища на етапі введення експлантатів у культуру *in vitro*.*

***Ключові слова:*** *Fagus sylvatica L.*, культура *in vitro*, експлантати, стерилізація, живильне середовище, життєздатність.

Бук лісовий (*Fagus sylvatica L.*) – цінний лісотвірний вид України, який широко використовують у господарстві: виробництво меблів, машинобудування, виготовлення паркету, шпал, музичних інструментів, у кондитерській промисловості, в зеленому будівництві тощо. У природі поширюється, в основному, насіннєвим способом під пологом лісу. Нині ресурси *F. sylvatica* достатньо обмежені та не відтворюються в необхідних об'ємах. Це зумовлено значним зниженням плодоношення рослин бука лісового останніми роками та його малоефективним вегетативним розмноженням [6]. Тому застосування альтернативних методів розмноження рослин *F. sylvatica*, зокрема мікроклонального, є особливо актуальним [4, 5].

Хоча технологія мікроклонального розмноження для окремих генотипів рослин родини Букові розроблена достатньо добре (дослідження щодо мікроклонального розмноження видів родини *Fagaceae* проводили як вітчизняні так і зарубіжні автори: Джонс; Бутова, Скробова; Poljakova; Кушнір, Сарнацька; Гречанник та ін. [2, 3, 4, 6, 9]), однак метод культури тканин *in vitro*

належить до складновідтворювальних, оскільки реалізація морфогенетичного потенціалу експлантатів залежить від комплексу чинників – фізіологічних, генетичних, гормональних та фізичних [1, 4, 5]. Тому для різних генотипів рослин (навіть одного роду) застосовується диференційований підхід, який полягає у ретельному підборі віку донора та його фенологічної фази, типу експлантату, умов його стерилізації й культивування та доборі складових живильного середовища для різних етапів та типів мікроклонального розмноження.

**Мета дослідження** – відпрацювання методики введення експлантатів рослин *F. silvatica* в культуру *in vitro* для масового мікроклонального розмноження.

**Матеріали і методика дослідження.** У дослідженнях використано здерев'янілі пагони завдовжки 10–15 см, які ізолювали з 70-річних рослин *F. silvatica* у квітні-липні. Стерилізацію рослинного матеріалу проводили 70 %-вим етиловим спиртом (1 хв.), 2,5 %-вим NaClO (3–7 хв.), 1 %-вим AgNO<sub>3</sub> (3–7 хв.), 0,1 %-вим HgCl<sub>2</sub> (5 хв.). Як експлантати, використовували мікропагони завдовжки 10–15 мм. Асептичні умови створювали за методами, загальноприйнятими у біотехнології [1, 4]. Експлантати уводили в культуру *in vitro* на живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [8] з додаванням 2 г·л<sup>-1</sup> активованого вугілля, 1,0 мг·л<sup>-1</sup> 6-бензиламінопурину (6-БАП) та 3-індолілмасляної кислоти (ІМК). До живильного середовища також вносили 100 мг·л<sup>-1</sup> мезоінозиту та 6,6–6,8 г·л<sup>-1</sup> агару. Через 10–15 діб асептичні експлантати субкультивували на МС з половинною концентрацією макросолей та інозиту, з додаванням 15 г·л<sup>-1</sup> глюкози та 1,0 мг·л<sup>-1</sup> β-індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) й 0,1 мг·л<sup>-1</sup> БАП. Показник кислотності середовища (рН) доводили до рівня 5,7–5,9. Рослинний матеріал культивували у кліматичній камері LHS-150 за температури 24±2 °С і освітлення 2,0–3,0 клк з 16-годинним фотоперіодом та відносною вологістю повітря 70–75 %.

Статистичне опрацювання експериментальних даних виконували з використанням пакета аналізу MS Excel. У таблиці наведені середні арифметичні значення та їх стандартні похибки.

**Результати дослідження.** Отримання асептичних життєздатних експлантатів деревних видів рослин достатньо складне завдання, адже окрім екзогенного інфікування, рослини у віці понад 30 років інфіковані ендогенно. Тому необхідно ретельно добирати стерилізуючі речовини, їх концентрації та час обробки експлантатів (табл.).

#### **Ефективність стерилізації експлантатів рослин *F. silvatica***

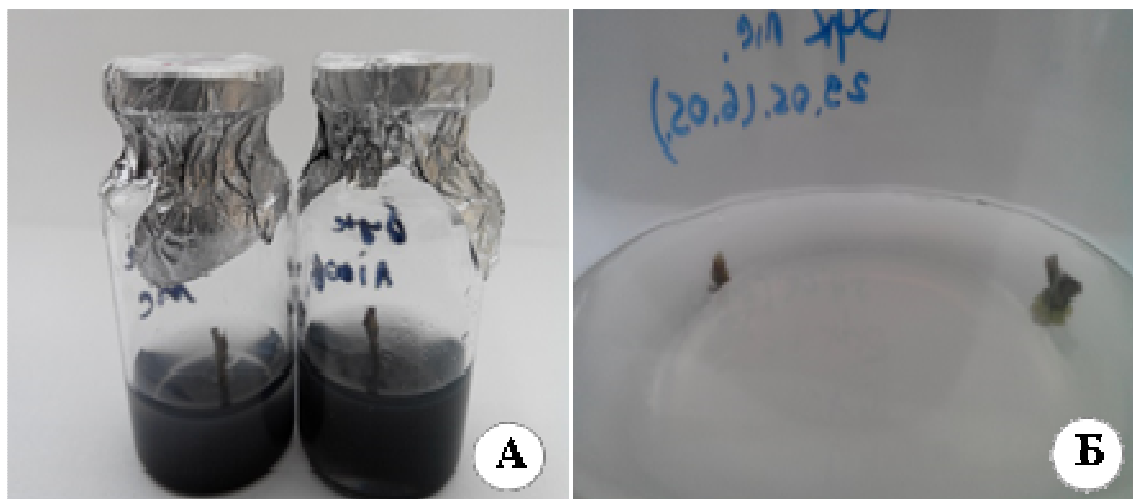
Варіант	Режим стерилізації експлантатів	Кількість асептичних експлантатів, %	Кількість життєздатних експлантатів, %	Ефективність стерилізації експлантатів, %
1	1 % AgNO <sub>3</sub> упродовж 7 хв.	50,0 ± 11,6	65,7 ± 17,8	30,0 ± 5,8
2	2,5 % NaClO протягом 7 хв.	40,0 ± 11,6	80,6 ± 10,0	30,0 ± 5,8
3	почергове витримування упродовж 3 хв. у 1 % AgNO <sub>3</sub> й 2,5 % NaClO	90,0 ± 5,8	84,2 ± 7,9	76,7 ± 12,0
4	0,1 % HgCl <sub>2</sub> протягом 5 хв.	80,0 ± 5,8	75,3 ± 6,8	60,0 ± 5,8

За нашими спостереженнями, левову частину (60 %) інфікування експлантатів *F. silvatica* становило грибне (виявилось на 2–10-ту добу культивування), на бактеріальне припало дещо менше – 30 % (проявлялось дещо пізніше, на 5–15-ту добу), змішаний тип інфікування охопив не більше 10 % (виявлявся на 2–15-ту добу).

Установлено, що для стерилізації експлантатів рослин *F. silvatica* неефективно використовувати 1,0 % AgNO<sub>3</sub> упродовж 7 хв. (варіант 1) чи 2,5 % NaClO (варіант 2), оскільки у цих процедурах фіксували надзвичайно малу ефективність стерилізації (30,0 ± 5,8 %).

Показано, що за умови застосування 0,1 % HgCl<sub>2</sub> упродовж 5 хв. у два рази підвищується ефективність стерилізації мікропагонів (відмінності статистично значущі за  $\alpha=0,05$ ), порівняно з варіантами 1 і 2. У результаті

експериментальних досліджень, нами визначено умови стерилізації експлантатів *F. silvatica*, ізольованих із рослин-донорів у квітні-червні (почергове витримування упродовж 3 хв. у 1 %  $\text{AgNO}_3$  й 2,5 %  $\text{NaClO}$ , варіант 3) з 76 %-вою ефективністю одержання асептичних життєздатних мікропагонів (рис. 1, А).



**Рис. 1. Результати стерилізації експлантатів рослин *F. silvatica*:**  
А) асептичні експлантати, 10 доба культивування (варіант стерилізації 3);  
Б) життєздатні мікропагони на МС з  $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  ІОК й  $0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$  6-БАП, 25 доба культивування

На 20–25 добу культивування експлантатів рослин *F. silvatica* фіксували активацію бічних бруньок, яка візуально проявлялась їх потовщенням. У 50 % рослинного матеріалу спостерігали утворення додаткових бруньок, у 90 % – фіксували розшарування основи мікропагона, його потовщення з наступним утворенням калюсу твердої консистенції світло-зеленої пігментації.

Отже, в результаті проведених досліджень відпрацьовано методику стерилізації експлантатів рослин *F. silvatica* та підібрані складові живильного середовища на етапі введення в культуру *in vitro*, що дозволило одержати значну кількість асептичного життєздатного рослинного матеріалу. Отримані мікропагони використовуються для масового мікроклонального розмноження.

**Висновки.** Установлено, що для забезпечення ефективності стерилізації експлантатів рослин *F. silvatica* понад 70 % їх необхідно ізольовувати із рослин-

донорів у квітні-червні та витримувати упродовж 3 хв. у 1 %  $\text{AgNO}_3$  з наступним перенесенням у 2,5 %  $\text{NaClO}$ .

Визначено, що експлантати 70-річних рослин-донорів *F. silvatica* характеризувалися високою вимогливістю до складових живильного середовища.

Показано, що для введення експлантатів доцільно використовували живильне середовище МС з додаванням 2 г·л<sup>-1</sup> активованого вугілля, 1,0 мг·л<sup>-1</sup> 6-БАП та ІМК з наступним обов'язковим (через 10–15 діб) субкультивуванням на МС з половинною концентрацією макросолей та інозиту, з додаванням 15 г·л<sup>-1</sup> глюкози та 1,0 мг·л<sup>-1</sup> ІОК й 0,1 мг·л<sup>-1</sup> 6-БАП.

### Список літератури

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Бутенко Р.Г. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Бутова Г.П. Морфогенез и регенерация растений дуба черешчатого в культуре *in vitro* / Бутова Г.П., Скробова Л.Л. // Физиология растений. – 1998. – 35, вып. 5. – С. 1023–1030.
3. Джонс О.П. Размножение хозяйственно важных древесных растений *in vitro* / Джонс О.П. // Биотехнология сельскохозяйственных растений. – М. : Агропроиздат, 1987. – С. 134–152.
4. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин : теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К.: Наукова думка : Ін-т фізіології рослин і генетики, 2005. – 269 с.
5. Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин : підр. [для студ. агробіол. та біол. спец., наук., викл., асп.] / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К.: Поліграфконсалтинг, 2003. – 520 с.
6. Пат. 68765 Україна, МПК (2012.01) А01Н 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.

7. Шиманюк А.П. Дендрология / Шиманюк А.П. – М.: Лесн. пром-сть, 1967. – 334 с.

8. Murashige T. A revised medium for rapid, growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473.

9. Poljakova L.W. Biochemical marker of the oak leaves (*Quercus robur* L.) on resistant to *Microsphaera 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.

*Разработаны методические подходы получения асептических жизнеспособных эксплантатов in vitro растений бука лесного (Fagus silvatica L.). Подобран оптимальный состав питательной среды на этапе введения эксплантатов в культуру in vitro.*

**Ключевые слова:** *Fagus silvatica L., культура in vitro, эксплантаты, стерилизация, питательная среда, жизнеспособность.*

*The approaches of obtaining of aseptic viable in vitro explants of beech (Fagus silvatica L.) plants were presented. The optimal composition of culture medium on in vitro explants introduction stage was developed.*

**Key words:** *Fagus silvatica L., tissue culture, explants, sterilization, medium, viability.*