

ЛІСОВІ КУЛЬТУРИ, БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ЛІСОВА МЕЛІОРАЦІЯ

УДК 630.232:576.32

УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНИХ РЕГЕНЕРАНТІВ МАГНОЛІЇ КОБУС (*MAGNOLIA KOBUS* DC.) У КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

І.М. Бобошко-Бардин, асистент

*Наведено удосконалену методику ступінчастої стерилізації експлантів магнолії з використанням натрію гіпохлориту та срібла нітрату. Рекомендована ефективна схема одержання асептичної культури *Magnolia kobus* DC.*

Експлант, стерилізація, асептична культура, магнолія.

Останнім часом активізувалися роботи з розмноження деревних рослин методом культури тканин. *Magnolia kobus* DC. тривалий час залишалася рідко досліджуваним видом через видоспецифічну складність її культивування, пов'язану з низькою регенераційною здатністю її вегетативних органів і тканин як в природних умовах, так і на штучному середовищі [5, 6]. У цьому контексті особливо актуальними є дослідження з удосконалення як окремих етапів мікроклонального розмноження (відбір експлантів, їх асептування, отримання стерильної культури, морфогенез і ризогенез, адаптація регенерантів тощо), так і його технології загалом [4, 7].

Стерилізація експлантів і одержання асептичної культури життєздатних рослинних тканин і органів, з яких починається культивування в умовах *in vitro*, значною мірою, визначають ефективність мікроклонального розмноження і, тим самим, зумовлюють важливість цих досліджень.

Необхідність удосконалення традиційного способу одержання асептичної культури *Magnolia kobus* DC. пов'язана з його низькою ефективністю, яка обумовлена характерними для неї морфологічними особливостями пагонів, зокрема, їх опушеністю. Дослідженнями встановлено, що вони суттєво погіршують якість стерилізації експлантів [2].

Загальновідомо, що в ході одержання вільного від патогенів і вірусів вихідного матеріалу з належною реалізацією тотипотентності клітинами експланта, значення мають не тільки застосовувані стерилізанти та експозиція обробки, а і особливості технології стерилізації, зокрема, послідовність їх використання.

У проведених нами дослідженнях з асептування експлантів магнолії, як стерилізуючі речовини були апробовані розчини срібла нітрату (AgNO_3)

© *І.М. Бобошко-Бардин, 2012*

та натрію гіпохлориту «АСЕ» (NaHClO), з концентраціями відповідно: 0,01 %, 0,1, 1, 1,65, 2,5, і 5 % [2]. У проведеному експерименті з асептування вказаними розчинами стерилізували відібрані експланти з експозиціями: 5, 10, 15 та 20 хвилин. Дослідженнями встановлено, що у варіантах з м'якими умовами стерилізації (розчинами малої концентрації та мінімальними експозиціями) загибель експлантатів відбувалася через інфікування культури, а при використанні жорстких – внаслідок некрозу рослинних тканин. У цьому разі якщо навіть не відбувалось ураження експлантатів патогенами, через 2–3 доби після стерилізації спостерігалось відмирання їх тканин [2, 3].

До чинників, що суттєво ускладнюють процес одержання асептичної культури магнолії (як вважають деякі дослідники) належать також такі морфологічні особливості виду: наявність сочевичок, опушення бруньок та близьке їх прилягання до пагонів [1, 5, 6].

У той же час деякі науковці свідчать про можливість підвищення ефективності асептування вихідного матеріалу, використовуючи ступінчасту стерилізацію експлантів деревних рослин [7]. У поодиноких випадках вона, за даними авторів, дозволяла одержати до 100 % асептичного рослинного матеріалу. Проте низька життєздатність експлантатів *Magnolia kobus DC.* та наведені вище видоспецифічні особливості зумовили необхідність вдосконалення технології стерилізації магнолії [1].

Мета дослідження – удосконалення технології одержання життєздатного, неінфікованого матеріалу регенерантів *Magnolia kobus DC* з огляду на уточнення методик добору реагентів і стерилізації експлантів та визначення послідовності їх використання з урахуванням видоспецифічних особливостей породи.

Матеріали і методика дослідження. Програмою досліджень вбачалась оцінка ефективності послідовного застосування таких розчинів стериліантів: 1 %-й срібла нітрат (AgNO_3) з різною експозицією (5–20 хв), 2,5 % концентрацією комерційного натрію гіпохлориту – (NaHClO) і 2,5 % медичного антибактерицидного засобу на основі антибіотиків «Мікроцид» з експозицією 5 хв. (табл. 1). Оскільки деревним рослинам властиве накопичення внутрішньої інфекції, то в деяких варіантах (вар. 6 і 7) до складу живильного середовища ми додавали антибіотик «Канаміцин» (100 і 200 мг/л).

Експериментальні дослідження проводилися в лабораторії мікроклонального розмноження кафедри лісовідновлення та лісорозведення Національного університету біоресурсів і природокористування України. Вихідним матеріалом слугували одно- та дворічні пагони з верхівковими і пазушними бруньками, які відбирали в період активного росту пагонів (травень-липень) з 21-річної *Magnolia kobus DC.* ботанічного саду університету [2, 3].

У дослідженнях з мікроклонального розмноження *Magnolia kobus DC* вперше апробовано схему ступінчастої стерилізації експлантів з використанням розчинів срібла нітрату (AgNO_3) та натрію гіпохлориту «АСЕ»

(NaHClO), що дозволило удосконалити існуючу методику і тим самим суттєво підвищити ефективність асептування вихідного матеріалу.

У дослідженнях з отримання асептичної культури використовували базове живильне середовище Мурасіге і Скуга [8] з додаванням активованого вугілля 1 мг/л та БАП 1 мг/л. Апробована методика ступінчастого асептування експлантів містила ряд етапів, а різні послідовності їх проведення характеризували два контролю і п'ять варіантів стерилізації (табл. 1).

1. Варіанти розчинів стериліантів, їх концентрація та експозиція асептування експлантів *Magnolia kobus* DC. у досліді

Варіанти	Стериліанти та їх концентрації	Експозиція, хв
1	АСЕ 2,5 % (контроль)	5 – 20
2	AgNO ₃ 1 % (контроль)	5 – 20
3	АСЕ 2,5 % + антибактеріальний засіб "Мікроцид"	5 – 20
4	AgNO ₃ 1 % + антибактеріальний засіб "Мікроцид"	5 – 20
5	AgNO ₃ 1 % + АСЕ 2,5 %	5 – 20
6	AgNO ₃ 1 % + АСЕ 2,5 % + антибіотик "Канаміцин" 100 мг/л	5 – 20
7	AgNO ₃ 1 % + АСЕ 2,5 % + антибіотик "Канаміцин" (можливо канаміцин) 200 мг/л	5 – 20

На першому етапі застосовували загальноприйняті методики стерилізації: ретельне промивання рослинного матеріалу у мильному розчині упродовж 40 хв. з подальшим відмиванням експлантів під проточною водою з таким же часом експозиції та у дистильованій воді [4].

Подальшим етапом було занурення у 70 %-й етанол упродовж 1 хв., потім у комерційний розчин «АСЕ» 2,5 %-й або у срібла нітрат 1 %-й на 5–20 хв. з подальшим відмиванням у стерильній дистильованій воді тричі по 10 хв. [2, 3].

З метою удосконалення та підвищення ефективності процесу одержання неінфікованих культур у своїх дослідженнях застосовували ступінчасту стерилізацію. Вона складалася з загальноприйнятих методик у поєднанні з декількома стериліантами одночасно (табл.2.):

- відмивання у детергенті 40 хв.;
- відмивання у проточній та дистильованій воді 40 хв.;
- 70 %- й етанол на 1 хв.;
- 1 %-й розчин срібла нітрату з часом експозиції 5–20 хв.;
- відмивання у стерильній дистильованій воді 1 хв.;
- 2,5 %-й розчин натрію гіпохлориту «АСЕ» 10 хв.;
- відмивання стерильною дистильованою водою тричі по 10 хв.

Результати дослідження. Дослідженнями встановлено, що застосування ступінчастої стерилізації експлантів незалежно від експозиції, більш ефективно для одержання асептичної культури *Magnolia kobus* DC., ніж традиційна схема. Насамперед, помітними переваги цього методу були у варіантах 6–7 з додаванням антибіотика «Канаміцин» до живильного середовища Мурасіге та Скуга, (рис. 1). Життєздатність незаражених екс-

плантів у цих варіантах становила 38–72 % (рис. 2), з ознаками некротичних змін 14–28 % та інфікування 14–44 %.

2. Етапи ступінчастої схеми стерилізації експлантів *Magnolia kobus* DC.

Етапи стерилізації експлантів	Контроль 1	Контроль 2	Дослідні варіанти					Експозиція, хв.
			1	2	3	4	5	
Детергент	+	+	+	+	+	+	+	40
Етанол	+	+	+	+	+	+	+	1
АСЕ 2,5 %	+		+		+	+	+	10
AgNO ₃ 1 %		+		+	+	+	+	5-20
Антибактеріальний засіб "Мікроцид"			+	+				5
Культивування на живильному середовищі MS з антибіотиком "Канаміцин"	100 мг/л					+		
	200 мг/л						+	

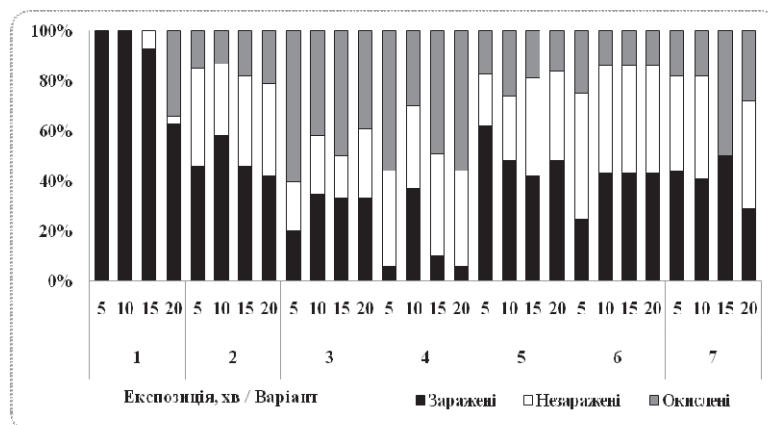


Рис. 1. Ефективність різних варіантів ступінчастої стерилізації експлантів *Magnolia kobus* DC

У цьому разі застосування одного стериліанта, а саме розчину «АСЕ» з концентрацією 2,5 % (варіант 1-контроль) не давало позитивного результату, більше того у варіантах з експозицією 5–10 хвилин відбувалося майже 100 % зараження вихідного матеріалу (рис. 3). Незначний відсоток (3–7 %) незаражених експлантів у 1 варіанті дослідів відмічали лише при збільшенні часу їх витримки у стериліанті до 15–20 хв. Однак асептичні регенеранти зберігали свою життєздатність нетривалий час (7–14 днів) і з часом відмирали (рис. 3).



Рис. 2. Загальний вигляд незаражених життєздатних експлантів *Magnolia kobus* DC. асептованих за схемами варіантів 6 та 7

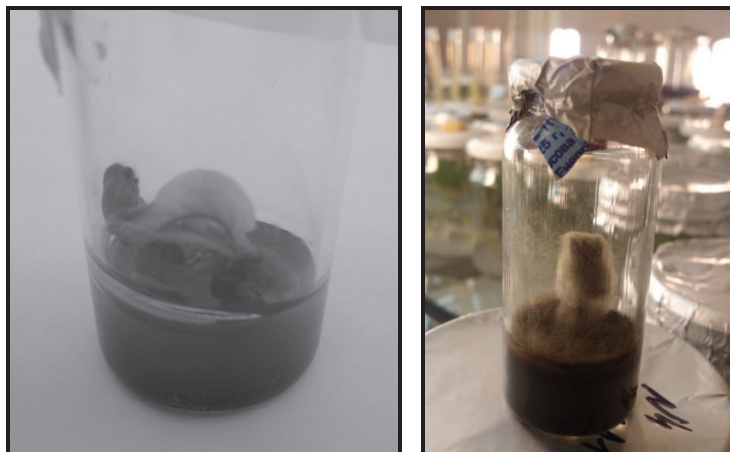


Рис. 3. Загальний вигляд експлантів *Magnolia kobus* DC., простерилізованих натрію гіпохлоритом «АСЕ»: некротичні (зліва), інфіковані (справа)

Найбільше експлантів з некротичними ознаками (8–60 %) спостерігається у варіантах 3 і 4, в яких було поєднано основні стерилізанти «АСЕ» 2,5 %-й і AgNO_3 1 % -й з антибактеріальним засобом «Мікроцид». Отже, комбінація таких реагентів була занадто токсичною для експлантів і, значною мірою, зумовлювала їх загибель.

Як свідчить рис. 1, найстабільніші результати з отримання неінфікованого матеріалу були у досліді за умови додавання до живильного середовища антибіотика «Канаміцин» (вар. 6 і 7). Незалежно від його концентрації отримували від 38 до 72 % асептичних експлантів *Magnolia kobus* DC. Це свідчить, що застосування антибіотика у живильному середовищі є доцільними для одержання асептичної та життєздатної культури у ході мікроклонального розмноження деревних рослин, у тому числі *Magnolia kobus* DC.

Одночасно з цим, одержані результати свідчать, що підвищення ефективності отримання асептичних експлантів можна досягти використовуючи ступінчасту стерилізацію за схемою, яка складається з загальноприйнятої методики з послідовним зануренням експлантів у стерилізуючі розчини:

- відмивання у детергенті 40 хв.;
- відмивання у проточній та дистильованій воді 40 хв.;
- 70 %-й етанол на 1 хвилину;
- 1 %-й розчин срібла нітрату (AgNO_3) з часом експозиції 15 хв.;
- відмивання у стерильній дистильованій воді 1 хв.;
- 2,5 %-й розчин натрію гіпохлориту «АСЕ» (NaHClO) 10 хв.;
- відмивання стерильною дистильованою водою тричі по 10 хв.;
- висаджування на живильне середовище Мурасіге та Скуга з додаванням антибіотика «Канаміцин» 200 мг/л.

Використовуючи цю схему стерилізації ми одержали 72 % стерильних життєздатних експлантів *Magnolia kobus DC.* (рис. 1, 2). Застосовуючи запропоновану ступінчасту стерилізацію ми спромоглися підвищити одержання асептичних експлантів у середньому на 40–45 % порівняно з варіантом 1 (контроль по «АСЕ») та 10–15 % порівняно з варіантом 2 (контроль по AgNO_3).

Висновки

Підвищення ефективності стерилізації експлантів деревних рослин з характерними морфологічними видоспецифічними особливостями можливе у зв'язку з послідовним застосуванням розчинів стериліантів у оптимізованих для певних порід концентраціях і експозиціях обробітку.

Найефективнішою технологією асептування експлантів магнолії є ступінчаста стерилізація їх розчинами реагентів у такій послідовності: детергент (40 хв.); 70 %-й етанол (1 хв.); 1 %-й срібло азотнокисле (15 хв.); 2,5 %-й натрію гіпохлорит (10 хв.).

Результативність стерилізації експлантів магнолії кобус може бути підвищена завдяки додаванню до живильного середовища Мурасіге та Скуга антибіотика «Канаміцин», який пригнічує внутрішнє зараження пагонів.

Дослідження свідчать, що розроблена і апробована методика ступінчастої стерилізації експлантів з метою введення її в культуру *in vitro* є значно ефективнішою раніше застосовуваних і тому заслуговує на впровадження у практику.

Список літератури

1. Бобошко-Бардин І.М. Актуальність мікроклонального розмноження та особливості його використання для виробництва садивного матеріалу декоративних рослин [Електронний ресурс] / І.М. Бобошко-Бардин // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2009. – Вип. 135. – Режим доступу: www.nbu.gov.ua/portal/chem_biol/nvnau/2009_135/bim.pdf

2. Бобошко-Бардин І.М. Особливості отримання асептичної культури *Magnolia kobus* DC. в умовах in vitro / І.М. Бобошко-Бардин // Науковий вісник НУБіП України. – 2010. – № 147. – С. 141–148.

3. Бобошко-Бардин І.М. Особливості відбору експлантів *Magnolia kobus* DC. в умовах in vitro / І.М. Бобошко-Бардин // Тези доповідей учасників конференції науково-педагогічних працівників, наукових співробітників і аспірантів та 63-ї ювілейної студентської науково-виробничої конференції (НУБіП України, 2009). – К.: ФОП І.С. Майданченко, 2009. – С. 260.

4. Методичні рекомендації для мікроклонального розмноження деревних і трав'янистих рослин / [Мельничук М.Д., Новак Т.В., Пінчук А.П., Ключадаєнко А.А.]. – К.: НАУ, 2003. – 37 с.

5. Минченко Н.Ф. Магнолии на Украине / Н.Ф. Минченко, Т.П. Коршук. – К.: Наук. думка, 1987. – 184 с.

6. Петухова И. П. Магнолии в условиях юга российского Дальнего Востока / Петухова И.П. – Владивосток: Дальнаука. – 2003. – 101 с.

7. Полякова Л.В. Мікроклональне розмноження дуба звичайного (*Quercus robur* L.) in vitro з використанням сіянців, потенційно стійких до борошнистої роси / Л.В.Полякова, Т.І. Таран // Лісівництво і агроеліорація. – Харків, 2004. – Вип. 106. – С. 239–243.

8. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T.Murashige F.Skoog // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – 473–497 p.

*Представлена методика ступенчатої стерилізації експлантів магнолії з використанням натрія гіпохлорита і срібра нітрата. Рекомендована ефективна схема отримання асептичної культури *Magnolia kobus* DC.*

Експлант, стерилізація, асептична культура, магнолія.

*The method of step sterilization of magnolia explants using hypochlorite sodium and silver nitrate is presented. The effective scheme of *Magnolia kobus* DC. aseptic culture obtaining is recommended.*

Explant, sterilization, aseptic culture, magnolia.

УДК 582. 477.6

ВПЛИВ РУХОМИХ ФОРМ СВИНЦЮ НА ФЕРМЕНТАТИВНУ АКТИВНІСТЬ ҐРУНТІВ У РИЗОСФЕРІ УРБОУКУЛЬТУРФІТОЦЕНОЗІВ ЯЛІВЦЮ КОЗАЦЬКОГО

О.Ф. Бровко, кандидат біологічних наук

Показано, що в урбокультурфітоценозах ялівцю, у разі підвищення вмісту рухомих форм свинцю в ґрунті, спостерігається пригнічення активності каталази та уреаз, а суттєві відмінності в їх активності були характерні для ризосфери із вмістом свинцю понад 23,3 мг·кг⁻¹ ґрунту.

© О.Ф. Бровко, 2012