

ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ БАГАТОВІКОВОГО ДЕРЕВА *TILIA CORDATA* MILL. «ЛИПИ Т. Г. ШЕВЧЕНКА»

С.Ю. Білоус, асистент

Обґрунтовано актуальність мікроклонального розмноження історично цінних багатовікових дерев. Наведено особливості введення в культуру та здатність до морфогенезу *in vitro* Липи Т. Г. Шевченка залежно від генотипу, типу експланта та складу живильного середовища. Відпрацьовано етап отримання асептичної культури багатовікової Липи Т. Г. Шевченка за результатами якого ефективність стерилізації сягала 70 % експлантів, що формували регенеранти.

Мікроклональне розмноження, експлант, живильне середовище, рослина-регенерант, *in vitro*.

Нині в Україні та світі актуальними є не лише передові технології з отримання альтернативних джерел енергії, клонування, генетична інженерія тощо. Дуже гостро стоїть також питання збереження, охорони та лікування багатовікових дерев, пам'яток історії, культурні надбання, що знаходяться на межі загибелі. Існуючі технології розмноження видів деревних рослин неефективні в даному випадку, оскільки вони неспроможні забезпечити 100 % передачу генетичного матеріалу. Тому альтернативою традиційним методам розмноження є впровадження технологій виробництва високоякісного, оздоровленого, садивного матеріалу, серед яких провідне місце займає мікроклональне розмноження (МКР) [1, 3, 4, 7].

Липа Т. Г. Шевченка – багатовікове дерево віком до 1000 років. *Tilia cordata* Mill. – липа серцевидна або дрібнолиста – представник роду *Tilia*, цінний деревний вид для лісового та садово-паркового господарства [2]. За даними деяких авторів, за своїм фізіономічним типом липа належить до декоративно-листяних (тіньових) деревних рослин, декоративні властивості яких полягають у своєрідності листків і крони [5, 6]. Багатовікове дерево Липа Т. Г. Шевченка включено до складу пам'ятки історії «Садиба родини Лизогубів», яка знаходиться за адресою: Чернігівська область, Чернігівський район, смт. Седнів, вул. Т. Шевченка, 116, відповідно до Постанови Кабінету Міністрів України від 03.09.2009 № 928 «Про занесення об'єктів культурної спадщини національного значення до Державного реєстру нерухомих пам'яток України» (рис. 1).

Метод культури ізольованих тканин і органів знайшов своє застосування в отриманні садивного матеріалу рідкісних, історично-цінних видів дерев з метою відновлення і збереження їх духовної та культурної спадщини.

Мета дослідження – підбір оптимальних умов стерилізації для одержання стерильно чистої культури багатовікової Липи Т.Г. Шевченка в умовах *in vitro*. Це є одним із важливих факторів, від яких залежить успішність МКР.

При цьому слід зазначити, що метою стерилізації є не лише отримання вільних від патогенів, хвороб, вірусів і шкідливих мікроорганізмів експлантів, а й збереження їх здатності до морфогенезу та калюсоутворення.



Рис. 1. Багатовікове дерево *Tilia cordata* Mill.
«Липи Т. Г. Шевченка» у природі

Матеріали та методика досліджень. Багатовікове дерево «Липи Т. Г. Шевченка» як об'єкт МКР мало ряд особливостей, які враховували при розробці методів стерилізації, а саме:

- зменшення активності фізіологічних процесів у тканинах дерева, викликане його значним віком, що знижує регенеративну здатність;
- можливість вірусного зараження вихідного дослідного матеріалу на клітинному рівні;
- значне ураження шкідниками і хворобами;
- фенольна інтоксикація за рахунок продуктів вторинного обміну, що пригнічують ріст рослини.

У дослідженнях експлантами були здерев'янілі фрагменти пагонів з брунькою та штучно пробуджені бруньки. Пагони нарізали на фрагменти по 3–5 см і промивали у мильному розчині протягом 20 хв (інтенсивно помішуючи). Потім зразки переносили у посудину зі стерильною дистильованою водою. Всі наступні маніпуляції проводили в ламінарному боксі.

Стерилізацію розпочинали із занурення вихідного матеріалу у 70 %-й розчин етанолу (30–40 с). Після цього використовували різні стерилізуючі речовини: 0,5–5 %-й розчин натрію гіпохлориту (NaClO 10–30 хв), 16,5–50 %-й розчин пероксиду гідрогену (H_2O_2 10–15 хв), 0,8–1,0 %-й розчин срібла нітрату (AgNO_3 5–10 хв). Всі роботи з культури ізольованих тканин та органів проводили за загальноприйнятими методами [1, 1].

Перед висадкою на агаризоване живильне середовище експланти розрізали на сегменти 1,0–2,0 см з одним і більше міжвузлям.

У процесі роботи, відповідно до кожного етапу при вивченні морфогенетичних реакцій тканин і органів експлантів *T. cordata* використовували живильні середовища (ЖС) за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [8]. Для підвищення морфогенетичного потенціалу експлантів та регулювання процесів морфогенезу до складу живильних середовищ вносили у різних співвідно-

шеннях та концентраціях фітогормони цитокінінового 6-бензиламінопури (БАП) ($0,5-1,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$), тідіазурон (ТДЗ) ($0,5-1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$), кінетин ($0,25-0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) типу дії. Також до живильних середовищ додавали $7 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ агару, $0,1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ мезоінозиту, джерелом вуглеводного живлення була сахароза $30 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$, величина рН середовища – $5,6-5,7$. Додатково до складу ЖС вносили активоване вугілля в концентрації $1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$. Останнє, очевидно, адсорбує інгібітори росту, які виділяються тканинами рослин, або містить домішки типу монофенілаламінів, що прискорюють ріст.

Експланти культивували за температури $+24 \pm 2^\circ \text{C}$, 16-годинному фотоперіоді при постійному освітленні інтенсивністю 2000–3000 лк.

Стерилізація є невід'ємною частиною на перших етапах мікроклонального розмноження. Якість її, значною мірою, залежить від стерилізанта, його концентрації та експозиції. Оптимальний добір стерилізуючої речовини полягає в тому, щоб вона знешкоджувала патогенну мікрофлору і якомога менше шкодила рослинним тканинам. Виникали труднощі у стерилізації об'єктів з тріщинами, заглибинами, пошкодженнями. У цьому випадку не лише поверхнева стерилізація, але й проникання всередину стерилізуючого розчину негативно впливало на ріст тканини *T. cordata* в умовах *in vitro*. Тому необхідно було підбирати стерилізуючий розчин, який легко вимивався з тканин дистильованою водою або розкладався, щоб не отруювати тканину. За основний показник ефективності стерилізуючої речовини було прийнято кількість експлантів, що нормально розвивались в культурі *in vitro*.

У результаті випробувано декілька варіантів стерилізації залежно від виду стерилізуючої речовини і часу експозиції для багатовікової *T. cordata*.

Результати досліджень. Ріст і розвиток первинних експлантів варіювали залежно від стерилізуючої речовини, яку використовували на початку введення та типу експланта. Також важливим було багаторазове субкультивування рослин, через фенольну інтоксикацію, кожні 2 дні протягом першого тижня і далі щотижня впродовж місяця. Такі заходи дозволили отримати більший відсоток первинних регенерантів з вихідних експлантів.

Штучно пробуджені бруньки краще піддавалися стерилізації за використання в якості стерилізанта розчину H_2O_2 (50 %) з експозицією 5 хв та триразовим відмиванням у стерильній дистильованій воді (5 хв) (рис. 2). За таких умов отримано 55 % асептичних та здатних до регенерації експлантів Липи Т. Г. Шевченка. На відміну від цього, здерев'янілі пагони були більш схильні до ураження. Як виявилось, інфікування проявлялося на третю добу, ефективність стерилізації при цьому дорівнювала 20 %. Як з'ясувалося, культивування таких культур на наступних пасажах супроводжувалося ендогенним грибним та бактеріальним інфікуванням.

Найефективнішою для фрагментів здерев'янілих пагонів виявилася комплексна стерилізація з використанням 70 %-го розчину $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (30 с), 1 %-го розчину AgNO_3 (7 хв), з одноразовим відмиванням у стерильній воді (1 хв), потім у 25 %-му розчині H_2O_2 (10 хв) і одноразовим відмиванням (5 хв). Ефективність стерилізації при цьому сягала 70 %. У всіх асеп-

тичних експлантів, отриманих у такий спосіб, через 25–27 діб спостерігали активацію пазушних бруньок, а через 35–40 діб – формування асептичних первинних мікропагонів (рис. 2).

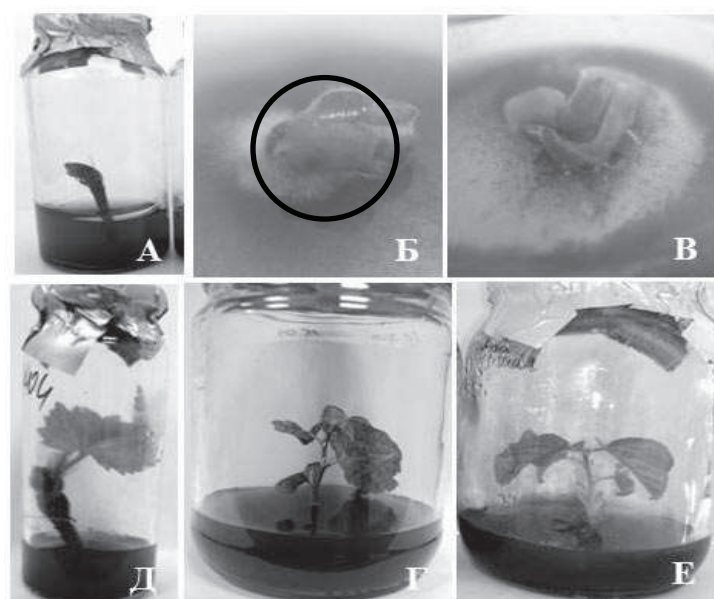


Рис. 2. Асептичні культури багатовікової *T. cordata*:

А, В – асептичний експлант, Б – грибне інфікування експланта,
Г – асептичний первинний мікропагін *in vitro*, Д, Е – рослини-регенеранти,
отримані прямим морфогенезом

Для підтримання в культурі *in vitro* одержані стерильні мікропагони пересаджували на середовище МС, яке містило вітаміни і регулятори росту групи цитокинінів БАП ($0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$), КІН ($0,25\text{--}0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) та ТДЗ ($0,25\text{--}1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$). На перших етапах мікророзмноження ефективним виявилось ЖС із додаванням ТДЗ у концентрації $0,25 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ та ЖС з $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП з додаванням активованого вугілля в усіх випадках. Субкультивовані первинні мікропагони вдало проявляли здатність до морфогенезу.

Отже, у результаті досліджень оптимальними експлантами для введення в культуру *in vitro* є як здерев'янілі, так і штучно пробудженні пагони багатовікової Липи Т. Г. Шевченка за умови індивідуального використання способу стерилізації. Відповідно для здерев'янілих – комплексна стерилізація з використанням 70 %-го розчину $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (30 с), 1 %-го розчину AgNO_3 (7 хв), з одноразовим відмиванням у стерильній воді (1 хв), потім у 25 %-му розчині H_2O_2 (10 хв) і одноразовим відмиванням (5 хв), для штучно пробуджених – 25 %-му розчині H_2O_2 (10 хв).

Таким чином, успішне отримання асептичних первинних експлантів та субкультивованих рослин-регенерантів створюють передумови для дослідження особливостей та підбору складових ЖС для їх подальшої масової регенерації, ризогенезу *in vitro* та підбору субстрату для адаптації до умов *ex vitro*.

Список літератури

1. Бутенко Р. Г. Биотехнология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р. Г. Бутенко. – М. : ФБК – Пресс, 1999. – 160 с.
2. Бутова Г. П. Морфогенез и регенерация растений дуба черешчатого в культуре *in vitro* / Г. П. Бутова, Л. Л. Скрябина // Физиология растений. – 1988. – Т. 35, № 5. – С. 1023–1030.
3. Горохольская В. С. Использование липы в полевых насаждениях и озеленении поселков / В. С. Горохольская. – М.-Л. : Гослесбумиздат, 1950. – 51 с.
4. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. – К. : Наук. думка, 2005. – 243 с.
5. 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/2008-4/08mmdomm.pdf>
6. Масальський В. П. Вікова структура роду *Tilia* L. в м. Біла Церква / В. П. Масальський // Старовинні парки та проблеми їх збереження : Матер. II Міжн. наук.-практ. конф. – К. : Фітосоціоцентр, 2003. – С 147–150.
7. Совакова М. О. Досвід використання представників роду *Tilia* L. на ландшафтних об'єктах різних країн світу / О. М. Совакова, І. О. Сидоренко. – Наукові доповіді НУБіП України. – 2012. – № 6 (35). – [Електронний ресурс]. – Режим доступу : http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2012_6/12smo.pdf
8. Chalupa V. In vitro propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.) in vitro / V. Chalupa. – P., 1984. – 380 с.
9. Murashige T. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog / Physiol. Plant. – 1962. – 15, № 3. – P. 473–497.

Обоснована актуальность микроклонального размножения исторически ценных многовековых деревьев. Приведены особенности введения в культуру и способность к морфогенезу in vitro Липы Т. Г. Шевченка в зависимости от генотипа, типа экспланта и состава питательной среды. Отработано этап получения асептической культуры многовековой Липы Т. Г. Шевченка, по результату которого эффективность стерилизации достигала 70 % эксплантов, формировавших регенеранты.

Микроклональное размножение, эксплант, питательная среда, растение-регенерант, in vitro.

The actuality of microclonal propagation of historically centuries-old trees are justify. The peculiarities introduction to the culture and capacity for morphogenesis in vitro Linden T. G. Shevchenko depending on genotype, explants type and composition of the nutrient medium. Worked out the stage of getting aseptic culture of centuries Linden T. G. Shevchenko which resulted in the efficiency of sterilization reached 70 % of explants that formed regenerants.

Microclonal propagation, explants, nutrient medium, plant-regenerants, in vitro.