

ISSN 0558-1125

УДК 57.085.2 : 634. 14

**Ю. М. БУНДУК**<sup>1</sup>, молодший науковий співробітник

**В.В. ХОМЯК**<sup>1</sup>, науковий співробітник

**І.П. ГРИГОРІЮК**<sup>2</sup>, член-кореспондент НАН України

**А.А. КЛЮВАДЕНКО**<sup>2</sup>, кандидат сільськогосподарських наук

<sup>1</sup>Українська науково-дослідна станція карантину рослин ІЗР НААН

<sup>2</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування, Україна

## **ОСОБЛИВОСТІ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖУВАННЯ АЙВИ МС**

**Y.M. BUNDUK**<sup>1</sup>, Junior Research Worker

**V.V. KNOMYAK**<sup>1</sup>, Research Worker

**I.P. GRYGORYUK**<sup>2</sup>, Correspondent Member of NAS of Ukraine

**A.A. KLYUVADENKO**<sup>2</sup>, PhD

<sup>1</sup>Ukrainian Research Station of Plant Quarantine of IPR of NAAS

<sup>2</sup>National University of Life and Environmental Resources Ukraine

## **PECULIARITIES OF THE QUINCE MC MICROPROPAGATION**

*Визначено найоптимальніші параметри стерилізації експлантів айви МС для введення їх в культуру in vitro та мінеральний і гормональний склад поживного середовища для подальшої проліферації мериклональних рослин айви МС.*

*Определены самые оптимальные параметры стерилизации эксплантов айвы МС для введения их в культуру in vitro и минеральный и гормональный состав питательной среды для дальнейшей пролиферации мериклональных растений изучаемого растения.*

*The authors have determined the most optimal parameters of the quince MC explants sterilization to bring them into the culture in vitro and the nutrient medium mineral and hormonal content for the further mericlinal proliferation of the studied crop plants.*

В Україні останнім часом відбувається масове закладання садів інтенсивного типу. Проте садивний матеріал для створення таких насаджень повинен відповідати ряду вимог. Насамперед, він має бути оздоровленим від вірусів, по-друге, придатним для закладання садів зі щільністю більше 1500 дерев на гектарі, тобто забезпечувати слаборослість, скороплідність, Садівництво. 2012. Вип. 66

© Бундук Ю.М., Хомяк В.В., Григорюк І.П., Ключаєнко А.А., 2012

високу продуктивність рослин і якість плодів. При вирощуванні таких саджанців особливу роль відіграють слаборослі (карликові та напівкарликові) підщепи [7].

Останніми роками вирощування садивного матеріалу для груші, як вегетативні підщепи, почали використовувати рослини айви звичайної (*Cydonia oblonga* Mill.), що дає змогу отримувати слаборослі, скороспілі і високоврожайні і стійкі до стресових факторів навколишнього середовища дерева. Однак будь-які вегетативні підщепи вимагають ретельного випробування в конкретних ґрунтово-кліматичних умовах, високої сумісності з прищепами і лише найвитриваліші з них, згідно з результатами комплексної перевірки, рекомендовані для виробництва [6].

Проте проблемою у вегетативному розмноженні рослин завжди було ураження їх вірусними, мікоплазмовими, бактеріальними та іншими інфекційними хворобами і як наслідок значна втрата продуктивності в розсадниках і садах. Якщо з фітопатогенними бактеріями і грибами успішно борються за допомогою хімічних засобів, то віруси та мікоплазмові інфекції є внутрішньоклітинними паразитами, що не дає можливості оздоровлювати рослини традиційними методами [3].

Перспектива переходу розсадницьких господарств на вирощування безвірусного стандартного садивного матеріалу, адаптованого до ґрунтово-кліматичних умов конкретної зони, обумовлює необхідність закладення в Україні маточних насаджень плодкових порід, створення маточно-насіньових і живцевих садів та розсадників, виробництва необхідної кількості саджанців сучасного породно-сортового складу. Стає очевидним, що перспективним у промисловому садівництві є отримання безвірусних базових клонів, оздоровлення їх в культурі *in vitro* та наступне прискорене розмноження із застосуванням біотехнологічних методів.

У більшості країн (США, Італії, Франції, Голландії) виробництво оздоровленого садивного матеріалу плодкових і ягідних культур з використанням клонального мікророзмноження поставлено на промислову основу і очевидна тенденція збільшення кількості такого матеріалу в майбутньому [9,10-12]. Технологія мікророзмноження із застосуванням культури меристем дозволяє отримати безвірусний оздоровлений садивний матеріал практично всіх сільськогосподарських культур. Разом з тим способи введення в культуру *in vitro* та умови культивування, відпрацьовані для одних видів і сортів рослин, не завжди можуть бути використані для інших, оскільки індивідуальна реакція різних генотипів при розмноженні в екстремальних умовах проявляється сильніше, ніж при традиційних способах [4, 5].

В Україні розмноження плодкових культур у пробірках залишається на лабораторній стадії. Тому на даному етапі особливо перспективними у промисловому садівництві республіки є технології отримання безвірусних базових клонів, оздоровлення їх в культурі *in vitro* і подальше прискорене розмноження класичними та біотехнологічними методами.

Впровадження їх дасть змогу не тільки підвищити морфогенетичний потенціал маточних і промислових насаджень, але й підвищить ефективність галузі в цілому.

**Методика.** Дослідження проводили в лабораторії біотехнології та селекційного відбору Української науково-дослідної станції карантину рослин Інституту захисту рослин НААН України.

Вихідний рослинний матеріал відібрали за такими помологічними ознаками: відсутність симптомів бактеріальних і вірусних хвороб і карантинних об'єктів. Айву МС надана нам приватним фермерським господарством «Яніс» (с. Малинці Хотинського району Чернівецької області) і рекомендована для лісостепової зони. Рослини вирощували в умовах відкритого ґрунту на колекційній ділянці вищезгаданої дослідної станції (с. Бояни Новоселицького району тієї ж області).

Для введення об'єктів досліджень в культуру *in vitro* використовували апікальні та латеральні бруньки, виділені з рослин без симптомів вірусної інфекції. З метою оптимізації умов одержання асептичних культур вегетативних підщеп айви звичайної застосовували поверхневу обробку рослинного матеріалу розчинами сулеми, нітрату срібла та перекису водню в різних концентраціях та неоднаковим часом експозиції.

Стерилізацію первинних експлантів (бруньок) здійснювали за такими схемами:

Варіанти стерилізації вихідних експлантів					
1.		2.		3.	
стерилізуючий агент	час експозиції	стерилізуючий агент	час експозиції	стерилізуючий агент	час експозиції
70%-й розчин етанолу	1с	70%-й розчин етанолу	1с	70% -й розчин етанолу	1с
стерильна вода	10 хв.	стерильна вода	10 хв.	стерильна вода	10 хв.
0,6%-й розчин срібла азотнокислого	40 с	0,6%-й розчин сулеми	40 с	10%-й розчин перекису водню	5 хв.
стерильна вода	10 хв.	стерильна вода	10 хв.	стерильна вода	10 хв.

Роботу проводили в умовах стерильного ламінар-боксу. Меристеми виділяли спеціальними мікрохірургічними інструментами з використанням мікроскопа MST 130. Розмір виділених меристем у межах 2-3 мм.

Апекси та мериклональні рослини культивували на живильних середовищах Мурасіге-Скуга, Кворіна-Лепуавра та Гамборга. В дослідях були використані регулятори росту – БАП та кінетин у концентрації 0,5-3 мг/л. Субкультивування на нові поживні середовища виконувалися кожних 2-3 тижні.

Режими культивування: температура –  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ; вологість повітря – 60-70%; освітленість – 2-3 тис. люкс; фотоперіод – 16 годин освітлення.

Оцінку ефективності введення об'єкту в культуру проводили за такими показниками: перша фаза – збільшення розміру апексів; друга – розкривання 2-3 примордіїв; третя – утворення мікророслин.

**Результати досліджень.** Отримання асептичної культури – один з елементів технології вирощування рослин *in vitro*. Стерилізуюча речовина, яку застосовують для цього, має знищувати клітини мікроорганізмів, не пошкоджуючи при цьому клітини рослин. Поєднання цих умов повною мірою неможливе, оскільки перша з них суперечить іншій [2].

Основним показником ефективності стерилізуючої речовини є кількість асептичних експлантів, що в подальшому оптимально розвиваються [1].

Нами було апробовано три способи стерилізації первинних експлантів. Як показано на рисунку 1, найбільшій стерильності експлантів айви МС (92 %) вдалося досягнути у варіанті з використанням 0,6%-го розчину азотнокислого срібла при експозиції 45-60 сек. При цьому максимальний відсоток життєздатних експлантів був на рівні 26,1. При застосуванні 0,6%-го розчину сулеми отримано 82% стерильних експлантів, 48% з яких були життєздатними. Найменшу кількість їх (5%) одержано при стерилізації 10%-м розчином перекису водню при 100%-ій життєздатності.

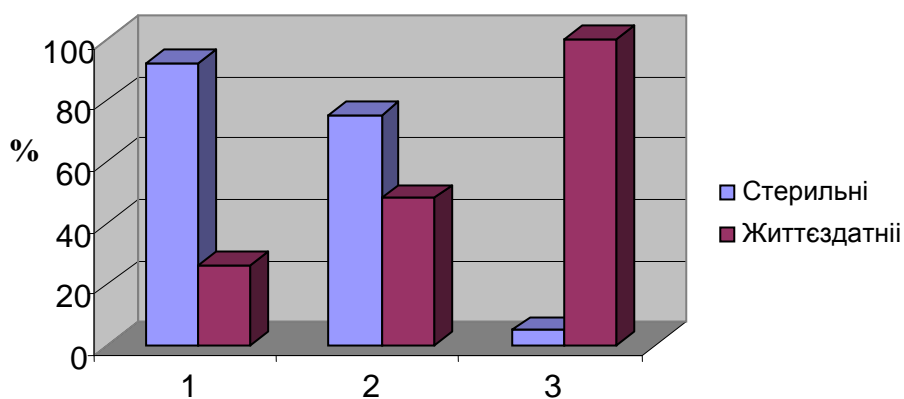


Рис. 1. Вихід стерильних життєздатних експлантів в залежності від стерилізуючих агентів(- азотнокисле срібло; 2 – сулема; 3 – перекис водню)

Регеновані мікропагони айви звичайної культивували на живильних середовищах, найбільш оптимальних, згідно з літературними даними [8]. Вивчення впливу мінерального складу поживних середовищ Мурасіге-Скуга, Кворіна-Лепуавра, Гамборга на розвиток меристем айви МС показало, що максимальна регенерація експлантів (45,6%) досягнута при використанні першого з цих середовищ. Протягом трьох місяців культивування 30,8% експлантів досягли третьої фази розвитку - формування мікророслин (рис. 2, 3, 4).

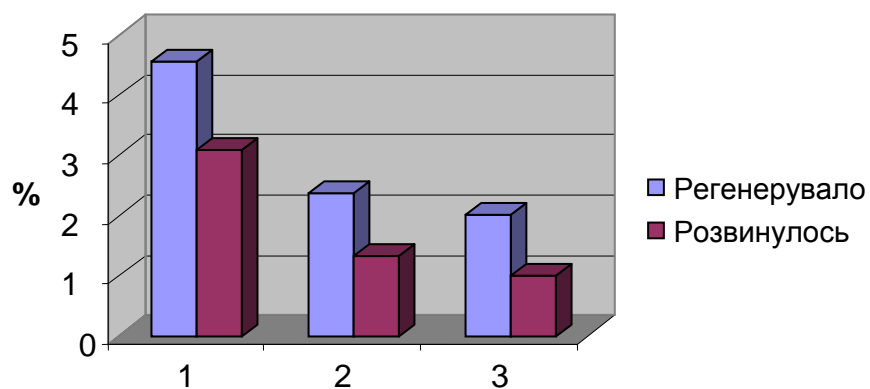


Рис. 2 Розвиток меристеми на живильних середовищах (1 - Мурашіге-Скуга; 2 – Гамборга; 3 - Кворіна-Лепуавра)

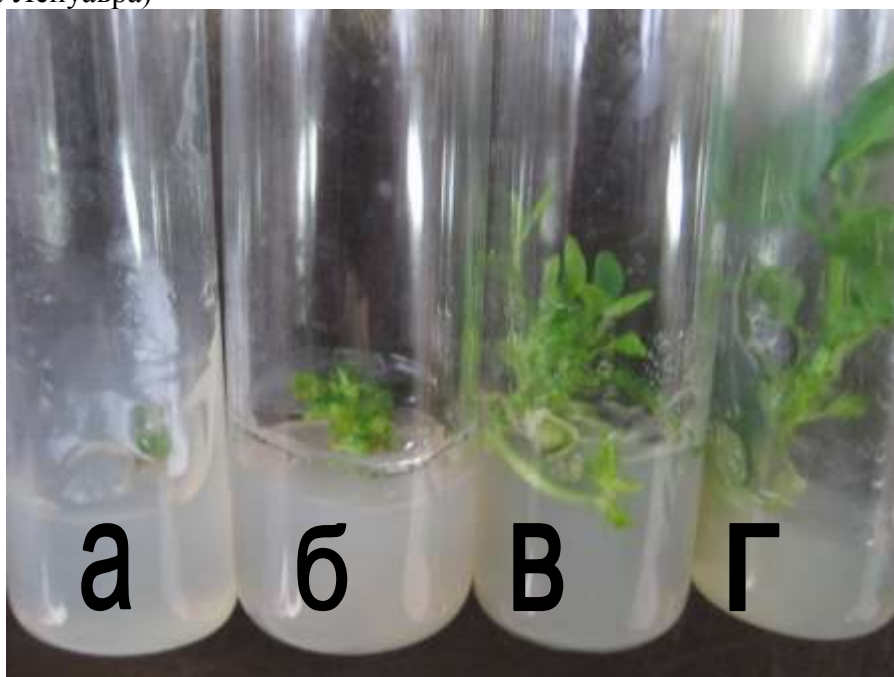


Рис. 3. Етапи морфогенезу айви МС на живильному середовищі Мурасіге-Скуга: а – перший місяць культивування; б – другий-третій місяці культивування; в – п'ятий місяць культивування; г – шостий-сьомий місяці культивування

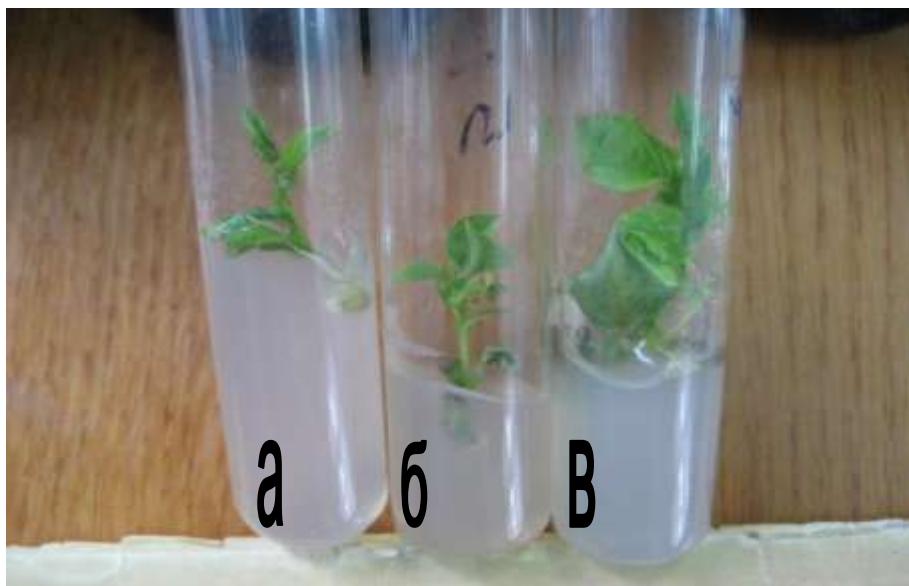


Рис. 4. Мікророслини айви МС, вирощені на живильних середовищах:  
а – середовище Гамборга; б – середовище Кворіна-Лепуавра; в- середовище Мурасіге-Скуга

На середовищі Гамборга активні ростові процеси відмічено у 23,8% апексів, з яких 13,3% почали формувати рослини-регенеранти. Диференціація меристематичної тканини на середовищі Кворіна-Лепуавр проходила менш інтенсивно, ніж на двох інших: кількість регенеруючих меристем в культурі складала 20%, апікальних меристем, що утворили мікророслини - близько 10%.

Вивчення впливу регуляторів росту цитокінінової групи на розмножування рослин айви МС в культурі *in vitro* показало, що додавання в поживне середовище Мурасіге-Скуга 0,5 мг/л 6-БАП ініціювало розвиток мікропагонів у кількості 1,3 штуки на 1 рослину (рис. 5).

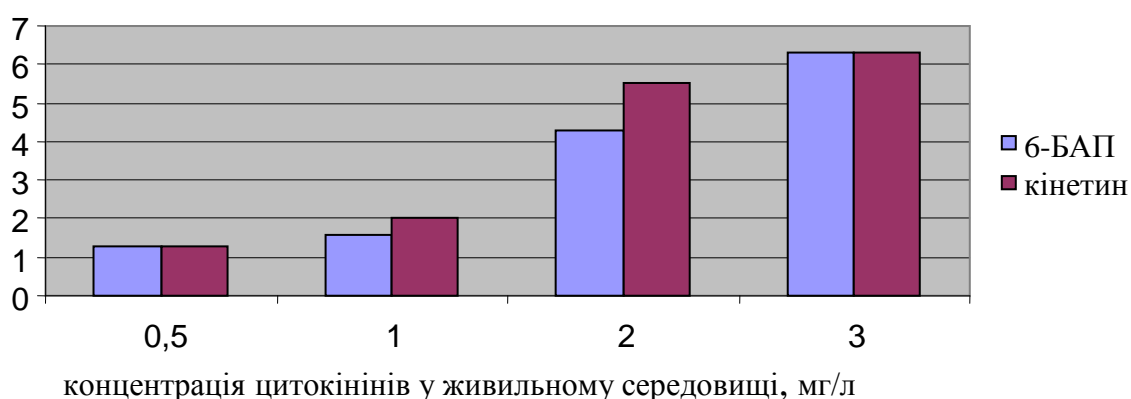


Рис. 5. Вплив деяких цитокінінів на проліферацію експлантатів айви типу МС

При концентрації регулятора росту в культуральному середовищі (6-БАП) 1,0 мг/л коефіцієнт розмноження був на рівні 2,0. Збільшення концентрації стимулювало пагоноутворення від 5,5 (2,0 мг/л БАП) до 6,3 (3,0 мг/л БАП) штуки на 1 рослину.

За використання кінетину кращі результати розмноження були досягнуті на середовищах, які містили регулятор росту в концентрації 3,0 мг/л. Коефіцієнт розмноження склав 6,3, як і при використанні 6-БАП у тих же концентраціях. Проте число слабозвинених рослин при застосуванні кінетину було вдвічі меншим, ніж у варіанті з 6-БАП (16,3% проти 32,8%). У рослин, вирощених на середовищах, які містили кінетин у концентраціях 0,5; 1,0; 2,0 мг/л, коефіцієнт розмноження становив відповідно 1,3; 1,6; 4,3 пагона на одну рослину і цим мало відрізнявся від відповідного показника у варіантах з 6-БАП.

**Висновки.** Дослідження показали, що оптимальною схемою стерилізації бруньок айви, котра забезпечує максимальний рівень життєздатних експлантів (48%), є їх обробка 0,6%-ним розчином сулеми протягом 45-60 секунд.

Найбільш ефективним, зокрема на етапі мікророзмноження, є використання середовища Мурасіге-Скуга, яке містить регулятори росту рослин цитокінінового ряду (БАП, кінетин) в концентрації 0,5 – 2,0 мг/л. Рівень регенерації експлантів на ньому вищий, ніж на середовищах Кворіна-Лепуавра та Гамборга.

Високі концентрації цитокінінів (3,0 мг/л) у культуральних середовищах можуть сприяти утворенню вітрифікованих і слабозвинених пагонів.

### **Список використаної літератури**

1. Бундук Ю.М. Ініціація культури айви звичайної *in vitro* / Ю.М. Бундук, І.П. Григорюк, М.Д. Мельничук, А.А. Ключаваденко // Вісн. аграр. науки. - 2011. - №5. – С.39-41.
2. Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений.- Алма-Аты: Конжык, 1996.-272с.
3. Довгань С.В. Фітосанітарний моніторинг/ С.В.Довгань, О.М. Орлова, О.Б. Сядриста // 22.01.09. [www.golvdergzahist.com.ua](http://www.golvdergzahist.com.ua).
4. Калинин Ф.Л. Технология микрклонального размножения растений/ Калинин Ф.Л., Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацкая. - Киев, 1992. - 232 с.
5. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений/ Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. - М.: Наука, 1983. - 97 с.
6. Клименко С.В. Айва обыкновенная .- Киев: Наукова думка, 1993.-284с.
7. Кондратенко П.В. Результати наукових досліджень та стан забезпечення садівництва України оздоровленим садивним матеріалом плодкових і ягідних культур // Доп. на засіданні Бюро Президії УААН, Київ, 25 жовтня 2007 р.
8. Кушнір Г.П. Мікрклональне розмноження рослин/ Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацкая / Теорія і практика.- Київ: Наукова думка, 2005.-242с.

9. Матушкина О.В. Будущее садов за клональным микроразмножением /О.В. Матушкина, И.Н. Пронина// Главный агроном.- 2004. - №9. - С.27-29.
10. D'Onofrio C., Morini S. Development of adventitious shoots from in vitro grown *Cydonia oblonga* leaves as influenced by different cytokinins and treatment duration //Biol. Plant.-2005.- 49, №1.-P.17-21.
11. Dumanoglu H., Gulsen Y. In vitro rooting of quince A (*Cydonia oblonga* Mill.) // ISHS Acta Horticulturae: VI Intern. Symp. on Pear Growing. - 1994.-P.367.
12. Khalil Al Maarri, Yolande Arnaud, Emile Miginiac. In vitro micropropagation of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) //Scientia Horticulturae. – 1986.-28. - P. 315-321.

Одержано редколлегією 29.03.12