10. Yilmaz A. The Effects of Cobalt-60 Applications on Yield and Yield Components of Cotton (Gossipium barbadense L.). A. Yilmaz, B. Erkan : Pakistan J. of Biol. Sci. – 2006. – № 15. – P. 2761–2769.

УДК 60:57.085.2:582.717.4

ДІЯ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА РЕГЕНЕРАЦІЙНУ ЗДАТНІСТЬ ТКАНИН РОСЛИН *HYDRANGEA MACROPHYLLA* L. В УМОВАХ *IN VITRO*

Нестерова Н.Г. *– к.с.-г.н., асистент, НУБіП України*
Чорнобров О.Ю. *– к.с.-г.н., науковий співробітник, ВП НУБіП України «Боярська лісова дослідна станція»*

У статті досліджено дію регуляторів росту цитокінінового та ауксинового типів дії на регенераційну здатність тканин рослин Hydrangea macrophylla L. в умовах in vitro. Підібрано компоненти живильного середовища на етапах власне мікроклонального розмноження та укорінення мікропагонів in vitro. Розроблено біотехнологію мікроклонального розмноження рослин H. macrophylla, використання якої дозволяє отримувати значну кількість рослин-регенерантів у стислі терміни.

Ключові слова: *Hydrangea macrophylla L., культура in vitro, експлантати, регенераційна здатність, регулятори росту, живильне середовище, мікроклональне розмноження.*

Нестерова Н.Г., Чорнобров О.Ю. Действие регуляторов роста на регенерационную способность тканей растений Hydrangea macrophylla L. в условиях in vitro

В статье исследовано действие регуляторов роста цитокининового и ауксинового типов воздействия на регенерационную способность тканей растений Hydrangea macrophylla L. в условиях in vitro. Подобрано компоненты питательной среды на этапах собственно микроклонального размножения и укоренения микропобегов in vitro. Разработана биотехнология микроклонального размножения растений H. macrophylla, использование которой позволяет получать значительное количество растений-регенерантов в сжатые сроки.

Ключевые слова: *Hydrangea macrophylla L., культура in vitro, эксплантаты, регенерационная способность, регуляторы роста, питательная среда, микроклональное размножение.*

Nesterova N.G., Chornobrov O.Yu. Growth regulator effect on the regenerative ability of plant tissues of Hydrangea macrophylla L. in in vitro conditions

The article explores the effect of growth regulators of cytokinin and auxin types of action on the regenerative ability of plant tissues of Hydrangea macrophylla L. in in vitro conditions. It specifies the components of the nutrient medium at the stages of actual microclonal propagation and rooting of microshoots in vitro. The study develops the biotechnology of microclonal propagation of plants H. macrophylla, using of which allows obtaining a significant number of plant regenerants within a limited period.

Keywords: *Hydrangea macrophylla L., in vitro culture, explants, regenerative capacity, growth regulators, nutrient medium, microclonal propagation.*

Постановка проблеми. Гортензія великолиста (*Hydrangea macrophylla* L.) – цінний представник родини Гортензієві (*Hydrangeaceae* Dumort.*)*, розміри суцвіть якого суттєво перевершують дикорослі рослини. У якості декоративної рос-

лини широко використовується для оформлення міських парків, скверів, алей тощо [1, с. 125-144].

Однак, незважаючи на широку популярність досліджуваної рослини, ефективна технологія масового отримання садивного матеріалу фактично відсутня, оскільки розмноження відсадками є малоефективним, внаслідок низького коефіцієнту укорінення; а насінням – складним та трудомістким через незначні його розміри (до 1 мм) [2, с. 70]. Крім того, вегетативне розмноження зумовлює поширення вірусних та бактеріальних захворювань, що значно обмежує його використання [3, с. 105-107]. Тому застосування такого альтернативного методу розмноження як мікроклональне, є особливо актуальним [3, с. 159-201; 4, с. 301-412]. Для окремих генотипів декоративно-квітучих кущів технології мікроклонального розмноження розроблені достатньо добре і активно використовуються для отримання рослин-регенерантів [4, с. 500]. Водночас, дослідження зарубіжних авторів відносно техніки отримання рослин *H. macrophylla* у культурі *in vitro* є фрагментарними [5, с. 304-307; 6, с. 450-520; 7, с. 166; 8, с. 526], а на території України інформація про подібні дослідження − відсутня. У нашій попередній публікації було зазначено методику введення експлантатів рослин *H. macrophylla* у культуру *in vitro* [9, с. 66].

Мета роботи − дослідження регенераційної здатності тканин рослин *H. macrophylla in vitro* за дії регуляторів росту для масового мікроклонального розмноження з подальшим адаптуванням до умов відкритого ґрунту.

Матеріали і методи дослідження. Ефективна стерилізація (понад 80 %) експлантатів, ізольованих із 5-ти річних рослин-донорів *H. macrophylla* (форма суцвіття − махрова біла) у фенофазі розгортання листків досягалася шляхом витримування у 0,1 % розчині $HgCl_2$ упродовж 10 хв. Експлантати, ізольовані у фенофазі цвітіння доцільно витримувати упродовж 5 хв у 1 % $AgNO_3$ з наступним перенесенням у 2,5 % NaClO. Регенераційна здатність експлантатів, ізольованих із рослин-донорів у фенофазі розгортання листків, достовірно вища, ніж у фенофазі цвітіння [9, с. 67]. Введення експлантатів у культуру *in vitro* проводили на безгормональному живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [10, с. 115]. Регенераційну здатність тканин рослин визначали на живильному середовищі МС за дії регуляторів росту цитокінінового (0,25 мг·л$^{-1}$ кінетину, 0,1 − 3,0 мг·л$^{-1}$ БАП, 1,0 мг·л$^{-1}$ 2-ір) та ауксинового (1,0 мг·л$^{-1}$ ІОК, 0,5 − 2,0 мг·л$^{-1}$ ІМК) типів дії. Показник кислотності середовища (pH) доводили до рівня 5,8−5,9. Рослинний матеріал культивували за загальноприйнятою методикою [11, с. 105; 12, с. 201-217]. Морфометричні показники мікропагонів фіксували на 60 − 65 добу культивування. Статистичне опрацювання експериментальних даних виконували з використанням пакету аналізу *MS Excel*. У таблиці наведено середні арифметичні значення та їх стандартні похибки.

Результати дослідження. Функціонування коливального процесу диференціації і морфогенезу в культурі ізольованих тканин і органів рослин відбувається шляхом внесення екзогенних регуляторів росту − ауксинів, цитокінінів та гіберелінів [6, с. 138-140; 8, с. 525]. У наших дослідженнях використовували регулятори росту цитокінінового (БАП і кінетин, 2-ір) та ауксинового типів дії, і визначали їх дію на ріст та розвиток мікропагонів *H. macrophylla* (табл 1).

Таблиця 1 - Дія регуляторів росту на морфометричні показники мікропагонів рослин *H. macrophylla in vitro* (МС, 60−65 діб у культурі)

Варіант	Склад живильного середовища МС	Довжина мікропагона, см	Коефіцієнт розмноження	Інтенсивність регенерації кореневої системи[2]	Пігментація мікропагона	Тип мікроклонального розмноження
К[1]	безгормональне	4,2±0,3	4±1	активна	зелена	а. р. м. е.[3]
1	½ концентрації макросолей за МС, 50 мг·л$^{-1}$ інозитолу й 15 г·л$^{-1}$ глюкози, 1,0 мг·л$^{-1}$ ІОК й 0,1 мг·л$^{-1}$ БАП	5,5±0,6	5±1	-//-	-//-	-//-
2	2,0 мг·л$^{-1}$ ІМК	4,6±0,2	4±1	середня	-//-	-//-
3	0,25 мг·л$^{-1}$ кінетину	4,5±0,5	7±2	активна	-//-	-//-
4	0,25 мг·л$^{-1}$ кінетину й 0,5 мг·л$^{-1}$ ІМК	1,7±0,3	2±1	низька	світло-зелена	-//-
5	0,5 мг·л$^{-1}$ БАП	3,6±0,4	5±2	-//-	-//-	-//-
6	0,5 мг·л$^{-1}$ БАП й кінетину	2,0±0,2	7±2	-//-	зелена	п.м.[4]
7	1,0 мг·л$^{-1}$ БАП й 20 мг·л$^{-1}$ аденіну	1,9±0,2	2±1	-//-	-//-	а. р. м. е.[3]
8	3,0 мг·л$^{-1}$ БАП й 20 мг·л$^{-1}$ аденіну	1,1±0,2	2±1	низька	світло-зелена	-//-
9	1,0 мг·л$^{-1}$ 2-ір й 20 мг·л$^{-1}$ аденіну	2,1±0,4	2±1	активна	зелена	-//-

***Примітки**: 1. Контроль; 2. Інтенсивність регенерації кореневої системи: активна − більше, ніж 3 см; середня − 1,0−2,9 см; низька − менше, ніж 0,9 см; 3. Активація росту меристем експлантату (а. р. м. е.); 4. Прямий морфогенез (п. м.).*

Рослини *H. macrophylla* були мікроклонально розмножені за використання різних типів індукованого морфогенезу *in vitro*: активації росту меристем експлантата й прямого морфогенезу. В усіх варіантах живильних середовищ (включно і контроль), окрім 6 варіанту (0,5 мг·л$^{-1}$ БАП й кінетину) регенерація мікропагонів рослин *H. macrophylla in vitro* відбувалася шляхом активації росту наявних меристем експлантатів. Використання двох цитокінінів (БАП і кінетину, варіант 6) викликало значне закладання адвентивних бруньок у тканинах експлантатів. Усі варіанти досліджуваних живильних середовищ індукували ризогенез у мікропагонів, однак із різною інтенсивністю. Найактивніше коренеутворення фіксували у варіантах 1, 3, 9 та контроль, де одночасно відбувалася регенерація як кореневої системи, так і мікропагона. Суттєві результати з регенерації мікропагонів було одержано на живильному середовищі з ½ концентрації макросолей за МС, 50 мг·л$^{-1}$ інозитолу й 15 г·л$^{-1}$ глюкози, 1,0 мг·л$^{-1}$ ІОК й 0,1 мг·л$^{-1}$ БАП (варіант 1, рис. 1, в); 2,0 мг·л$^{-1}$ ІМК (варіант 2); 0,5 мг·л$^{-1}$ БАП (варіант 5).

Наукоємний практичний результат із мікроклонального розмноження рослин нами було досягнуто на середовищі з 0,25 мг·л$^{-1}$ кінетину (варіант 3), що дозволяє одержувати мікропагони зі значним коефіцієнтом розмноження (7±2) й характерною пігментацією та активною регенерацію кореневої системи (рис. 1, б, г). Таким чином, у результаті проведених досліджень нами визначено регенераційну здатність тканин рослин *H. macrophylla in vitro* за дії регуляторів росту та розроблено біотехнологію мікроклонального розмноження.

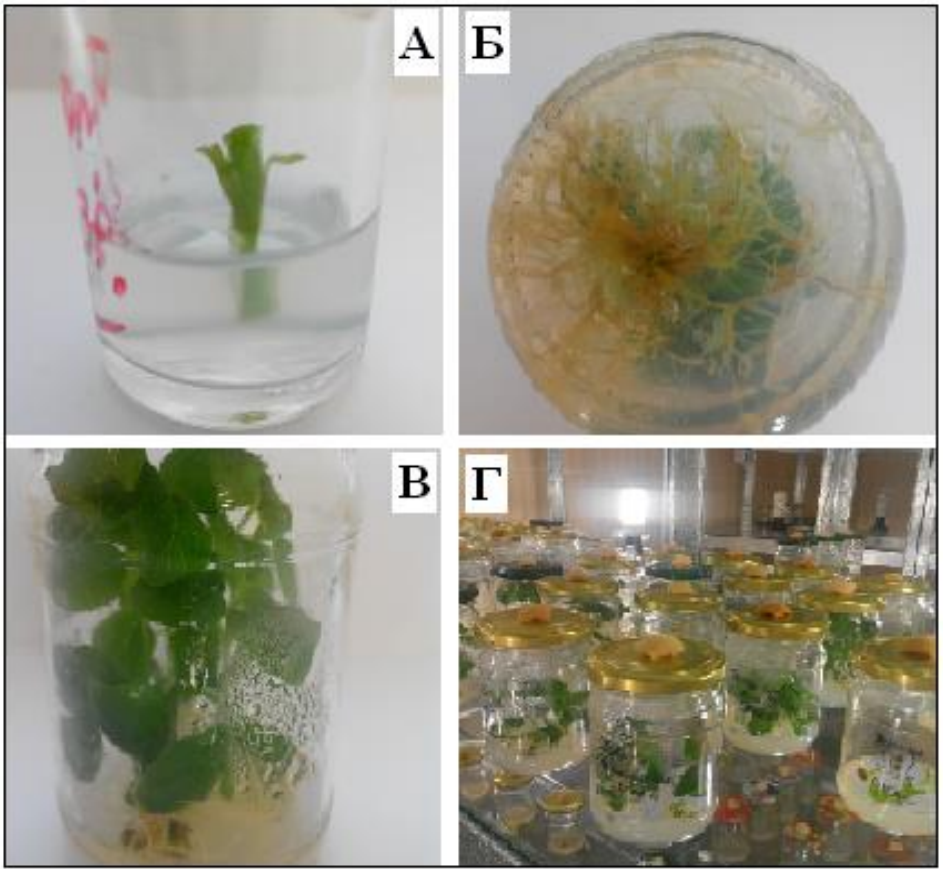

Рисунок 1 − Результат дії регуляторів росту на регенераційну здатність тканин рослин H. macrophylla у культурі in vitro: а) життєздатні експлантати на безгормональному МС; б) загальний вигляд кореневої системи рослин на МС з 0,25 мг·л$^{-1}$ кінетину, 60-та доба культивування; в) рослини-регенеранти на ½ концентрації макросолей за МС, з інозитолом, глюкозою й 1,0 мг·л$^{-1}$ ІОК й 0,1 мг·л$^{-1}$ БАП; г) масове клонування рослин-регенерантів у культуральному приміщенні.

Висновки. 1. Розроблено біотехнологію мікроклонального розмноження рослин *H. macrophylla*, яка включає різні типи індукованого морфогенезу *in vitro* (активація росту наявних меристем експлантата та прямий морфогенез) та дозволяє одержувати значну кількість рослин-регенерантів.

2. Досліджено дію регуляторів росту ауксинового та цитокінінового типів дії на регенераційну здатність тканин рослин *H. macrophylla in vitro.*

3. Установлено, що найоптимальнішими умовами для індукції прямого морфогенезу в тканинах мікропагонів *H. macrophylla in vitro* є використання живильного середовища МС з додаванням 0,5 мг·л$^{-1}$ БАП й кінетину, яке дозволяє упродовж 60 − 65 діб отримувати мікропагони (коефіцієнт розмноження − 7±2).

4. Для мікроклонального розмноження шляхом активації росту наявних меристем експлантата та активного розвитку кореневої системи, мікропагони

H. macrophylla доцільно культивувати на живильному середовищі МС з внесенням 0,25 мг·л$^{-1}$ кінетину.

5. Підібрано оптимальний склад живильного середовища та цикл культивування для мікроклонального розмноження, укорінення та одержання рослин-регенерантів *H. macrophylla* з подальшим адаптуванням до умов відкритого ґрунту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Колесников А.И. Декоративная дендрология [Издание второе, испр. и доп.] / А.И. Колесников − М.: Лесн. пром, 1974. − 704 с.
2. Hill L. *Hydrangea* / L. Hill, N. Hill // Country Journal, 1995. − V. 7 (8) − P. 70−71.
3. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин: теорія і практика [монографія] / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. − К.: Наук. думка, 2005. – 269 с.
4. Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин [підручник для студ. агробіол. та біол. спец., наук., викл., асп.] / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах – К.: Поліграфконсалтинг, 2003. – 520 с.
5. Sebastian T.K. *In vitro* propagation of *Hydrangea quercifolia* Bartr / T.K. Sebastian, C.W. Heurser // Scientia Hort., 1987. − V. 31. − P. 303−309.
6. Preece E.P. The influence of Thidiazuron on *in vitro* shoot proliferation of Oak leaf *Hydrangea* (*Hydrangea quercifolia* Bartr.) / E.P. Preece, D.I. Ledbetter // Acta Hort., 2003. − V. 2. − P. 625.
7. Dahab Abou T.A.M. *In vitro* propagation of *Hydrangea macrophylla* Thunb / T.A.M. Dahab Abou // Arab J. Biotech., 2007. − V. 10. − №1. − 161−178.
8. Douglas A.B. *In vitro* propagation of Florists *Hydrangea* / A.B. Douglas, G.R. Seckinger, P.A. Hammer // HortScience, 1986. − V. 21. − №3. − P. 525−526.
9. Нестерова Н.Г. Регенераційна здатність експлантатів рослин *Hydrangea macrophylla* L. в умовах *in vitro* / Н.Г. Нестерова, О.Ю. Чорнобров // Біотехнологія: звершення та надії: IV всеукр. наук.-практ. конф. студ., асп. та мол. вчених, 21-22 травня 2015 року: тези доповідей. – Київ, 2015. – С. 66−67.
10. Murashige T. A revised medium for rapid, growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // Physiol. plantarum, 1962. – V.15. − №3. – P. 473.
11. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений [Учеб. пособ.] / Р.Г. Бутенко – М.: Наука, 1964. – 272 с.
12. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. − К.: Наукова думка, 1980. − 488 с.