

УДК 518.143.6:634.2:  
632.38  
© 2012

*Т.В. Медведєва,*  
кандидат  
біологічних наук

*Н.В. Тряпичина,*  
кандидат сільсько-  
господарських наук

*В.Я. Рябий*

Інститут  
садівництва НААН

## **ВПЛИВ ГЕЛЕУТВОРЮВАЧІВ ТА ІНГІБІТОРІВ ЕТИЛЕНУ НА КУЛЬТИВУВАННЯ ПІДЩЕПИ ВИШНІ ГІЗЕЛА 5 В УМОВАХ *IN VITRO***

*Наведено результати досліджень щодо впливу альтернативних гелеутворювачів та інгібіторів етилену на розмноження та вкорінювання підщепи Гізела 5 (*P. cerasus* × *P. canescens*) в умовах *in vitro*.*

Однією з кращих клонових підщеп для вишні й черешні є карликова підщепа Гізела 5 (GiSeLA 5), отримана в Гіссенському університеті (Німеччина) схрещуванням видів вишні (*P. cerasus* × *P. canescens*), яка добре зарекомендувала себе в Європі та Північній Америці. Стійка до важких ґрунтів. Деревя черешні на ній стійкі до кокомікозу, мають добре розвинену кореневу систему і вирізняються високою скороплідністю — починають плодоносити з 2-го року після садіння. Сукупність цих та інших позитивних характеристик спричинює високий попит на підщепу для закладання інтенсивних садів. Однією з причин дефіциту саджанців черешні на Гізелі 5 є складність її вирощування традиційними способами через низьку укорінюваність відсадків. Мікроклональне розмноження *in vitro*, що є обов'язковим етапом у схемі виробництва здорового садивного матеріалу [1], може бути альтернативним методом розмноження, який дасть змогу підвищити обсяги виробництва та якість саджанців. Оскільки основою швидкої репродукції рослинного матеріалу є високий коефіцієнт розмноження, метою дослідження було вивчення впливу на цей показник гелеутворювачів гелриту і фітогелю під час культивування підщепи Гізела 5 в умовах *in vitro*, а також дії інгібіторів етилену (нітрату срібла і хлориду кобальту) на параметри вкорінювання мікропагонів.

**Методика досліджень.** Дослідження проводили у відділі вірусології, оздоровлення та розмноження плодівих і ягідних культур Інституту садівництва НААН. Для ініціювання культури *in vitro* використовували верхівкові та пазушні бруньки з рослин, перевірені на вірусносійство класичним сендвіч-методом імуноферментного аналізу [3]. Застосовано сертифіковані специфічні антитіла виробництва Loewe Phytodiagnostica (Німеччина). До роботи брали тільки безвірусні зразки. Під час ініціювання асептичної культури використовували

70%-й етанол і сулему (0,1%  $\text{HgCl}_2$ ). Експозиція стерилізації тривала 2–3 хв. На етапі введення в культуру, проліферації та вкорінення застосовували модифіковане живильне середовище Мурасіге — Скуга (MS) [5] з додаванням вітамінів і фітогормонів, рН=5,7.

Вивчали вплив 3-х гелеутворювачів на проліферацію мікропагонів — агар-агар (7 г/л) (Agar-Agar «D19» Hispanagar, B.K.M. Services LTD), фітогель (2,2 г/л) (Phytigel™, Sigma) та гелриту (2,2 г/л) (Gelrite® Gellan Gum, Sigma). Кількість пагонів (завдовжки >10 мм) на ініціальній експлант підраховували через місяць культивування. Для індукції ризогенезу до середовища додавали індолілмасляну кислоту (ІМК) у концентрації 1 мг/л. Загальний відсоток укорінених рослин, кількість і довжину коренів для кожного варіанта визначали через 1,5 міс. культивування. Живильні середовища для розмноження та укорінення стерилізували за допомогою автоклавування за 120°C і 1 атм упродовж 20 хв, а  $\text{CoCl}_2$  і  $\text{AgNO}_3$  — через мембранний фільтр ( $d=0,22 \mu\text{m}$ ) і після автоклавування додавали до середовища в концентрації 10  $\mu\text{m}$ . Мікропагони культивували упродовж 16-годинного світлового дня з освітленням 2000–2500 лк за 23–25°C і вологості повітря 50–60%. Контрольним варіантом під час укорінювання мікропагонів було безгормональне середовище.

**Результати досліджень.** Ріст і розвиток мікропагонів *in vitro* залежать від багатьох факторів, зокрема від хімічних і фізичних властивостей живильного середовища. Серед найважливіших чинників, що впливають на ці властивості, є тип і концентрація гелеутворювача, який забезпечує водний потенціал середовища і доступність елементів живлення до рослини. Найзастосовуванішими є 3 типи гелеутворювачів — агар, гелриту і фітогель. Для культури тканин рослин найчастіше використовують перший із них — природний полісахарид з високи-

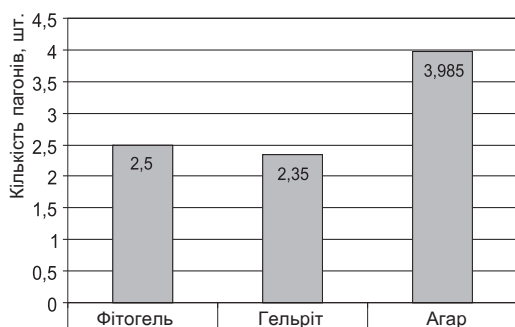


Рис. 1. Залежність коефіцієнта пагоноутворення у підщепи вишні Гізела 5 від типу гелеутворювача

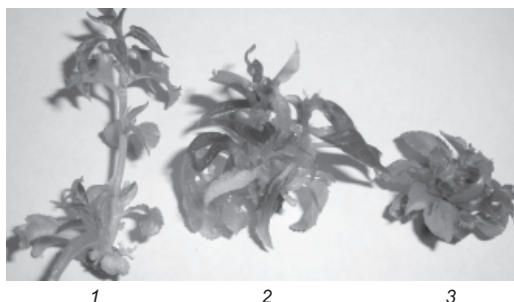


Рис. 2. Мікропагони підщепи вишні Гізела 5, культивовані на середовищі з різними гелеутворювачами: 1 — фітогель; 2 — гельрїт; 3 — агар

ми гелеутворювальними характеристиками. Проте агар, отриманий від різних виробників, містить різні забруднювачі, які можуть впливати на результати експериментів та ускладнювати їх порівняння. Гельрїт і фітогель — також полісахаридні комплекси, але ізольовані з бактерії *Pseudomonas elode*. Вони містять глюконову кислоту, глюкозу, рамнозу і значну кількість калію, натрію, кальцію та магнію [7], формують відносно прозорий гель і не містять фенольних компонентів та інших органічних забруднювачів, які можуть бути в агарі [2], до того ж їх концентрація в живильному середовищі значно нижча від агару (0,2%). З використанням гельрїту отримано кращі результати порівняно з агаром за регенерації та розмноження пагонів, калусоутворення і соматичного ембріогенезу різних культур. Додавання фітогелю до середовища для культивування картоплі за значно нижчої концентрації порівняно з агаром пришвидшувало утворення мікробульб з більшими розмірами [7] та підвищувало параметри мікророзмноження також і для *Rosa damascena* та *R. bourboniana* [6]. У наших дослідженнях, однак, вищий коефіцієнт пагоноутворення у підщепи Гізела 5 досягнуто на се-

редовищі з агаром — 3,98 проти 2,5 за використання фітогелю та 2,35 — з гельрїта (рис. 1). Культивування на середовищі з фітогелем спричиняло формування рослин з видовженими міжвузлями (рис. 2), а на середовищі з гельрїтом призводило до некрозу верхівок. В обох випадках спостерігали також гіпергідратацію пагонів. На середовищі, де як гелеутворювальний агент використовували 0,7%-й агар, рослини розвивалися з нормальною морфологією.

Отже, для культивування підщепи Гізела 5 в умовах *in vitro* оптимальним є застосування як гелеутворювача агару.

У циклі робіт з мікроклонального розмноження культур стадія укорінення є вирішальною, тому що від неї залежить наскільки успішним буде перенесення мікропагонів у субстрат для акліматизації та й сама акліматизація. Найчастіше для укорінення підщеп кісточкових культур використовують індолілмасляну кислоту в концентрації 1 мг/л. Установлено, що етилен, який виділяється рослинами під час їх культивування в закритих посудинах, пригнічує утворення адвентивних коренів у цілому ряду культур. Застосування ж його інгібіторів етилену у відповідних концентраціях сприяло збільшенню кількості коренів ( $\text{CoCl}_2$ ), підвищувало відсоток укорінених пагонів і зменшувало калусоутворення на базальній частині пагона ( $\text{AgNO}_3$ ) [4]. Такий ефект спостерігали за використання інгібіторів у вузькому діапазоні концентрацій, і найефективнішою виявилася концентрація в 10  $\mu\text{M}$ . Ми додавали хлорид кобальту та нітрат срібла у зазначеній вище концентрації в середовище для укорінення, що містило 1 мг/л ІМК.

Отримані нами результати (рис. 3, 4) узгоджуються з даними літератури щодо стимульовального впливу хлориду кобальту на збільшення кількості коренів — 17,3 проти 15 на середовищі без додавання інгібітора етилену.

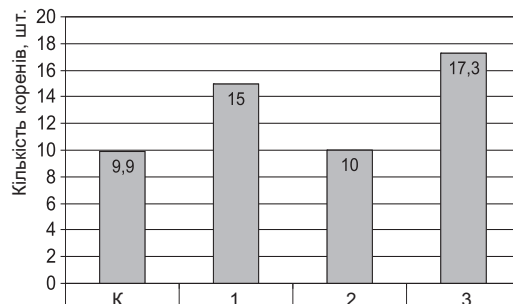
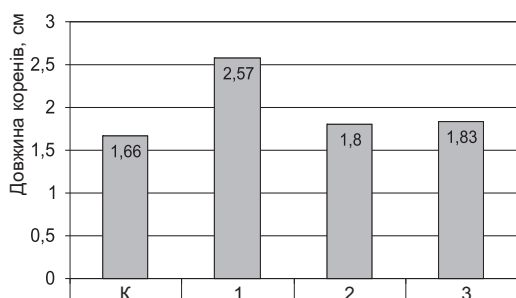


Рис. 3. Вплив інгібіторів етилену на ефективність ризогенезу у підщепи вишні Гізела 5: К — контроль; 1 — MS+1 мг/л ІМК; 2 — MS+1 мг/л ІМК +  $\text{AgNO}_3$ ; 3 — MS+1 мг/л ІМК +  $\text{CoCl}_2$



**Рис. 4.** Вплив додавання інгібіторів етилену до середовища для укорінення на довжину коренів підщепи вишні Гізела 5: К — контроль; 1 — MS+1 мг/л ІМК; 2 — MS+1 мг/л ІМК + CoCl<sub>2</sub>; 3 — MS+1 мг/л ІМК + AgNO<sub>3</sub>

Однак на середню тривалість застосування інгібітора і нітрату срібла мало негативний вплив, знизивши цей показник майже в 1,4 раза. Недостатнім виявився вплив також нітрату срібла на кількість коренів, що утворилися на експланті. Цей показник був майже однаковим з виявленим за відсутності стимуляції коренеутворення (10 і 9,9 шт. відповідно).

Кількість укорінених мікропагонів становила, %: у контролі та на середовищі з 1 мг/л ІМК — 100, за додавання CoCl<sub>2</sub> — 95 і у варіанті з AgNO<sub>3</sub> — 65. Добре розвинена коренева система сприяє кращій акліматизації, тому хлористий кобальт можна рекомендувати для додавання до середовища на стадії ризогенезу. Вплив нітрату срібла виявився неефективним і недостовірним.

## Висновки

У результаті досліджень нами було встановлено: для мікрোকлонального розмноження підщепи Гізела 5 оптимальним гелеутворювачем є агар-агар; застосування як гелеутворювачів гельриту і фітогелю призводить до гіпергідратації та некрозу верхівок мікропагонів; додавання до середовища для укорі-

нення хлориду кобальту в концентрації 10 мкг стимулює збільшення кількості коренів, тому цей інгібітор етилену можна використовувати для підвищення ефективності акліматизації мікропагонів; вплив нітрату срібла на коренеутворення у підщепи Гізела 5 виявився неефективним.

## Бібліографія

1. ДСТУ «Культури плодів та ягідні. Методи оздоровлення садивного матеріалу від вірусних та вірусоподібних інфекцій». — ДСТУ 7184:2010, чинний від 01.07.2011.
2. Buah J.N., Kawamitsu Y., Sato S., Murayama S. Effects of different types and concentrations of gelling agents on the physical properties of media and growth of banana (*Musa* spp.) *in vitro*//Plant Prod. Sci. — 1999. — № 2(2). — P. 138–145.
3. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of the enzyme — linked immunosorbent assay for the detection of plant virus//J. Gen. Virol. — 1977. — 34(3). — P. 475–483.
4. Ma H.J., Yao J.L., Cohen D., Morris B. Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation from apple shoot cultures//Plant Cell Reports. — 1998. — № 17. — P. 211–214.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures//Physiologia Plantarum. — 1962. — № 15. — P. 473–497.
6. Podwyszynska M., Olszewski T. Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homalomena//Scientia Horticulturae. — 1995. — 64, № 1–2. — P. 77–84.
7. Veramendi J., Villafranca M.J., Sota V., Mingo-Castel A.M. Gelrite as an alternative to agar for micropropagation and microtuberization of *Solanum Tuberosum* L. cv. Baraka//In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant. — 1997. — № 33. — P. 195–199.