

ВПЛИВ ЦИТОКІНІНІВ НА ВИРОЩУВАННЯ ЕКСПЛАНТІВ *ULMUS CAPRINIFOLIA* IN VITRO

Захарчук О. І., аспірантка

Постановка проблеми. Формове різноманіття і системна єдність складових лісоценозу значимо визначають його стійкість до несприятливих факторів. Досить цінною супутньою породою є в'яз граблистий (*Ulmus caprinifolia*) або берест. Проте значна частина *Ulmus caprinifolia* поступово вичерпує свій потенціал. В першу чергу це пов'язано із пошкодженням насаджень в'яза граблистого голландською хворобою.

Розмноження *Ulmus caprinifolia* генеративним (насінням) і вегетативним способами (вкорінення пневої порослі, живцями). Проте найбільш перспективним методом розмноження залишається мікроклональне розмноження, яке має ряд переваг в порівнянні із насінневим та вегетативним. Його застосування перш за все дає можливість значно збільшити коефіцієнт розмноження, по-друге, отримати оздоровлений садивний матеріал. Окрім того, мікроклональне розмноження являється ефективним способом збереження генотипів зрілих дерев, які являються потенційно стійкими до голландської хвороби.

Аналіз останніх досліджень. Перші вдалі спроби вирощування повноцінних, здатних до нормального розвитку рослин у лабораторних умовах на штучному поживному середовищі було зроблено ще у другій половині XIX століття Кнопом [15]. У подальшому в широкий вжиток увійшли й методики вирощування цінних рослин з окремих ізольованих частин або органів. Таким чином, у 50-60 роки XX століття почався справжній бум у цій галузі. Тоді було розроблено середовища Murasige&Skoog, D.White, W.Kruyt, A.Naagan-Skirm тощо. Вони майже незмінними використовуються і в наші дні для масового розмноження рослин у найрізноманітніших галузях. Більше того – вони є базовими для основної маси тих, що створюються та використовуються нині в рослинній біотехнології.

В Україні експериментальні роботи по культивуванню тканин рослин започатковані 1949 році в Інституті фізіології рослин АН УРСР. Активний розвиток різних напрямків біотехнології рослин припадає на 70-80 роки. У цей період в Інституті

ботаніки імені М.Г.Холодного під керівництвом академіка К.М.Ситника проводяться оригінальні роботи з гібридизації протопластів та клітинної селекції. [5].

Відтворення в'язів в культурі *in vitro*, зокрема в'яза американського практикують в Канаді, США, Китаї [9-14, 18]. Mukund R. Shukla та ін. [18] в своїх дослідженнях широко використовують живильні середовища MS (Murashige T., Skoog F. 1962), WPM (MacCown, Lloyd 1981), DKW (Driver and Kunyuki 1984) [16, 17].

Таким чином, закордонна практика вказує на доцільність використання культури *in vitro* для отримання садивного високопродуктивного садивного матеріалу *Ulmus caprinifolia*

Мета дослідження. Дослідити вплив гормонів росту на ріст експлантів *Ulmus caprinifolia* в умовах *in vitro*, вдосконалити відпрацьовані технології з мікроклонального розмноження.

Об'єкт та методи дослідження. Дослідження виконувалися на базі лабораторії селекції, біотехнології та мікроклонального розмноження хмелю Інституту сільського господарства Полісся НААН України.

Об'єктом для досліджень були експланти *Ulmus caprinifolia*, які отримували шляхом активації меристем у контрольованих умовах лабораторної кімнати ($t=24\pm 2^\circ\text{C}$, відносна вологість повітря 60-70%). Антисептики та режим стерилізації підбирали експериментально [1].

Важливу роль в процесі мікроклонального розмноження відіграють не лише генотипові та видові особливості культивованих клітин, тканин та органів, але й гормональний баланс, співвідношення цитокінінів та ауксинів в складі живильного середовища [4, 6, 8]. З метою визначення найоптимальнішого середовища використовувалися поживні середовища, які характеризувались різними співвідношеннями мікро та мікроелементів. Культивування здійснювали на середовищах WPM та MS [16, 17], що були підібрані в результаті лабораторних досліджень для розмноження експлантів даного виду. Із цитокінінів у середовища додавали 6-бензіламінопурин та кінетин, вітаміни, мезоінозит (100мг/л), сахарози (25г/л). Як гелюючі агенти використовували агар (6 г/л). Усі середовища мали рН 5,7-5,8. Культивування експлантів відбувалося у кімнаті з кондиціонованим повітрям на скляних стелажах за температури $25\pm 1^\circ\text{C}$, відносної вологості повітря 70-75%, фотоперіоду 16 годин і штучного освітлення інтенсивністю 3-5 тис. люкс. посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища готували згідно загальноприйнятих методик [4, 5, 11].

Результати дослідження. Найоптимальніший ефект стерилізації досягнуто за умов застосування 0,2% розчину HgCl_2 за експозиції 3хв. Вихід стерильних первинних експлантів у цьому варіанті досліді становив $(67,2\pm 3,0)\%$. Збільшення часу експозиції призводить до пригнічення розвитку експлантів та їх некротизації.

Культивування асептичних зародків проводили в без гормональному живильному середовищі. Після добору ефективного стериліанта, який дав змогу отримати найбільший відсоток стерильних і морфогенно здатних експлантів, перед нами постало питання стосовно активації меристеми. Важливим аспектом роботи був підбір складу та співвідношення фітогормонів у живильному середовищі.

Активацію меристем *Ulmus caprinifolia* зафіксовано на 8-му – 12-ту добу культивування. Спочатку фіксували розвиток листових пластинок. Потім відбувався посилений ріст пагона в'яза граблистого з добовим приростом 2-3мм. Ріст та розвиток експлантів припинявся на 23-тю – 3-ту добу культивування. Протягом даного періоду рослина *Ulmus caprinifolia* сформувала пагін завдовжки 2,5-3см та діаметром 1,5-3мм.

Для нарощування вегетативної маси використовували базові живильні середовища MS та WPM з додаванням БАП у чотирьох варіантах концентрацій 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мг/л.

Експланти, отримані на безгормональному середовищі, розділяли на сегменти,

які формували верхівкову бруньку, одну чи дві листові пластинки та стебло розміром 1-1,5 см. Такі сегменти культивували на запропонованих нами живильних середовищах протягом 30 діб. у процесі культивування спостерігали за формуванням довжини пагона, кількістю міжвузлів і активованих меристем, а також наявністю калюсу та кольором експланта. на 3-тю – 5-ту добу культивування на всіх варіантах живильного середовища зафіксовано збільшення об'єму експлантів і кількості листків (на першому варіанті середовища), потовщення основи пагона та активацію верхівкової меристеми. Активний ріст і розвиток пагонів відбувався протягом 9-23 діб культивування залежно від варіанта живильного середовища: I варіант – 9-13 діб, II – 10-19 діб, III – 10-23 доби, IV – 10-15 діб.

На першому і четвертому варіантах живильних середовищ експланти розвивались повільно, при цьому приріст пагонів у середньому становив 1,0-1,5 см. В умовах культивування визначено поодинокий розвиток меристем і формування калюсу (12-17 доба) на основі пагона, який на 17-25 добу відмирав та набував темно-коричневого кольору.

На другому і третьому варіантах живильних середовищ нами виявлено активний розвиток експлантів *Ulmus caprinifolia*. Довжина пагона становила на другому варіанті середовища 3,5-4,0 см, на третьому 4,0-5,0 см і формувалося 4-6 міжвузлів. У 82% експлантів відбувалася проліферація калюсу, що відзначався щільною структурою та світло-зеленим кольором. Структура та забарвлення калюсу свідчать про його морфогенетичну здатність до регенерації повноцінної рослини, що може бути використано в дослідженнях щодо отримання *Ulmus caprinifolia* шляхом непрямого морфогенезу.

Висновки. Як показали наші дослідження максимальну кількість пазушних меристем на одному мікро пагоні виявлено на середовищі, що містило макро- і мікро елементи згідно [16, 17] із додаванням 1, мг/л БАП. отриманий нами вперше рослинний матеріал досліджується на ризогенну активність і фізіологічні аспекти культури тканин та органів *Ulmus caprinifolia* в культурі *in vitro*.

Джерела використаної інформації

1. Захарчук О.И. Особенности асептической культуры ильмовых/ О.И.Захарчук// материалы МНК «Сельское хозяйство и агропромышленный комплекс на рубеже веков» - Новосибирск: ЦНРС, 2013 – с. 26 – 32.
2. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений/ Ф.Л.Калинин, В.В.Сарнацкая, В.Е.Полищук. – К.: Вид-во «Наук.думка», 1980. – 487 с.
3. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи/ В.А.Кунах. – К.: Вид-во «Логос», 2005. – 730 с.
4. Кушнір Г.П. Мікоклональне розмноження рослин, теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька – К.: Наук.думка, 2005. – 270 с.
5. Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин: підр.[для студ. вищ. навч. закл]/ Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А.. – К.: Поліграфконсалтинг, 2003. – 520 с.
6. Мельничук М.Д. Практикум з біотехнології рослин / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, А.А. Ключаваденко, А.П.Пінчук – К.: НАУ, 2005. – 137 с.
7. Черевченко Т.М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*/ Т.М.Черевченко, А.Н.Лаврентьева, Р.В.Иванников. – К. Вид-во «Наук. думка», 2008. – 560 с.
8. Шестибратов К.А. Перспективы использования технологии клонального микроразмножения в лесном хозяйстве ценных генотипов древесных растений / К.А. Шестибратов, А.И. Мирошников / Биотехнология. – Пущино, 2006. – с. 106 – 111.
9. Anna M-S, Mariella L, Lorenzo M. 1998. Elm tissue culture: micropropagation of clones resistant to Dutch Elm Disease. Acta Hort. 457: 235-242

11. Biroščíková M, Spišáková K, Lipták Š, Pichler V, Ďurkovič J. 2004. Micropropagation of mature wych elm (*Ulmus glabra* Huds.). *Plant Cell Rep.* 22(9): 640-644 CrossRef, Medline.
12. Chanon, A.M., Kamalay, J.C., and Jourdan, P. 1997. Micropropagation of juvenile and mature American Elms from stem nodal sections. In 11th Central Harwood Forest Conference. Edited by S.G. Pallardy et al. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Forest Experiment Station, Columbia, Mo. pp. 242–250.
13. Conde P, Sousa A, Costa A, Santos C. 2008. A protocol for *Ulmus minor* Mill. micropropagation and acclimatization. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 92(1): 113-119 CrossRef.
14. Durzan DJ, Lopushanski SM. 1975. Propagation of American elm via cell suspension cultures. *Can. J. For. Res.* 5(2): 273-277 Abstract.
15. Eshita SM, Kamalay JC, Gingas VM, Yaussy DA. 2000. Establishment and characterization of American elm cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 61: 245-249 CrossRef.
16. Fenning TM, Gartland KMA, Brasier CM. 1993. Micropropagation and regeneration of English Elm, *Ulmus procera* Salisbury. *J. Exp. Bot.* 44(7): 1211-1217 CrossRef.
17. George MW, Tripepi RR. 1994. Cytokinins, donor plants and time in culture affect shoot regenerative capacity of American elm leaves. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 39(1): 27-36 CrossRef.
18. McCown B.H. Woody plant medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species / B.H. MacCown, G.B.Lloyd // *Hort Science.* – 1981. – vol.16. – P.453.
19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T.Murashige, F.Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol.15, N2/3/ - P.473-497.
20. Mukund R. Shukla, A. Maxwell P. Jones, J. Alan Sullivan, Chunzhao Liu, Susan Gosling, Praveen K. Saxena. In vitro conservation of American elm (*Ulmus americana*): potential role of auxin metabolism in sustained plant proliferation/ Mukund R. Shukla, A. Maxwell P. Jones, J. Alan Sullivan, Chunzhao Liu,* Susan Gosling,† Praveen K. Saxena// *Canadian Journal of Forest Research.* - 2012. - Vol.42, N 4/4/ - P. 686-697.