ОСОБЛИВОСТІ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ЦІННИХ ВИДІВ ДЕРЕВНИХ РОСЛИН

Захарчук О.І.
Житомирський національній агроекологічний університет

Відтворення лісових насаджень за участю цінних видів деревних порід на нинішньому етапі розвитку суспільства є актуальним завданням лісового господарства. Одними із таким видів є представники роду В’яз (Ulmus L.). Однак основним лімітним чинником поширення та культивування в'язів у сучасний період є ступінь ураження видів голландською хворобою.

У зв’язку з цим зростає значення вегетативного розмноження рослин, яке дозволяє у повній мірі зберегти цінні ознаки материнських особин [9, 5]. Розв’язання проблеми розмноження та оздоровлення деревних порід роду В’яз можливе за умови використання сучасних досягнень біотехнології, одним з яких є метод мікроклонального розмноження. Цей метод має ряд переваг порівняно з широко застосовуваними способами вегетативного розмноження деревних рослин, оскільки дає можливість у стислі строки одержати масовий, генетично однорідний садивний матеріал з високими спадковими властивостями продуктивності та стійкості до збудника графіозу; скоротити і підвищити ефективність селекційного процесу; проводити роботу впродовж всього року; зекономити виробничі площі та використовувати передові

індустріальні технології [9, 5]. Безумовно, цей метод є технологічно складнішим, ніж збереження у польових умовах, потребує відповідного обладнання і реактивів. Однак часом він є майже єдиним способом зберегти види, представлені малою кількістю екземплярів, або унікальні генотипи.

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 [20]. 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.Haagan-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. [8].

При виконанні лабораторних досліджень слід враховувати ряд чинників, як зовнішніх, так і внутрішніх, від яких залежить подальше мікроклональне розмноження. Найголовнішим із внутрішніх вважається генотип маточного матеріалу, що впливає на подальше вкорінення експлантів. Так, наприклад, успішність вкорінення J. regia [20] залежно від генотипу може коливатися від 5 до 95%. Аналогічні результати зустрічаємо в дослідах D. Eward з модриною, де з 42 досліджених клонів лише 2 були здатні до пагоноутворення та ризогенезу [19]. Основною вимогою до вибору материнської (донорської) рослини є її не ураженість збудниками грибних, бактеріальних і вірусних хвороб [9]. Велике значення має також джерело експлантат. Доведено, що отримання добре сформованих повноцінних рослин для деревних листяних порід, найлегше досягнути при використанні як маточного матеріалу базальних секцій гілок з нижніх частин крони. [7, 8, 17].

Крім названих вище чинників, досить суттєвим є період забору матеріалу. Більшість дослідників найкращим часом вважають або період спокою, або період активної вегетації [4].

З літературних даних [5, 11] відомо, що мікроклональне розмноження генетично цінних екземплярів деревних порід значно ускладнене також вкрай низькою регенеративною активністю рослин старого та зрілого віку. Найлегше досягнути морфогенезу при використанні 1-3-річних сіянців та зародків, а старий матеріал є найскладнішим для введення в культуру in vitro.

Необхідним етапом, під час введення в культуру рослинного матеріалу, є стерилізація, що сприяє вивільненню його від епіфітних мікроорганізмів. Для вирішення цього питання для *Ulmus laevis Pall*., *Ulmus scabra mill*. та *Ulmus*

foliacea Gilib потрібно провести підбір стерилізаторів, а також визначити відповідні концентрації та експозиції.

Загальноприйняті методики стерилізації передбачають промивання вихідного матеріалу теплою водою з господарським або антибактерицидним милом, очищення експлантат від зайвих тканин і додаткове промивання дистильованою водою [13, 17]. Підготовлені таким чином експланти занурюють у стерилізуючи розчини (етанолу (70-96%)) [3 - 7, 10], «Білизна» [10, 5, 6], нітрату срібла ($AgNO_3$) [7,10], хлораміну (2-10%), гіпохлориду кальцію (7-10% $Ca(ClO)_2$) або натрію (NaOCl) та інших рекомендованих препаратів [2, 3, 7, 10, 18]. Останнім та обов'язковим етапом стерилізації експлантів є їх багаторазове промивання в дистильованій воді [2, 7, 10]. Метою стеилізації є не тільки отримання вільного від шкідливих мікроорганізмів, патогенів та вірусів експлантів, а і збереження їх здатності до морфогенезу та калюсоутворення [6, 7].

Крім того, для розмноження деревних порід через культуру *in vitro* необхідно підібрати поживні середовища та необхідні стимулятори росту, які забезпечать найоптимальніше приживлення та розвиток експлантів. Стимулювання пагоно- та коренеутворення досягають за рахунок встановлення необхідних співвідношень цитокінінів і ауксинів та їх концентрацій у живильному середовищі [16]. Приготування їх здійснюють індивідуально для окремих рослин з урахуванням їх видових особливостей.

Дослідженнями встановлено, що ауксини зумовлюють диференціацію клітин, а цитокініни індукують їх для отримання калюсних тканин. Для отримання стеблового морфогенезу знижують вміст ауксинів. До складу найбільш важливих ауксинів входять: 2,4 – дихлорфеноцтова (0,1 -10,0 мг/л), нафтилоцтова (0,1 – 2,0 мг/л) та індолілоцтова кислоти (1-30 мг/л) [10]. Для індукції калусогенезу використовують більш високі концентрації ауксинів. Як цитокініни використовують Беатин (0,001-10,000 мг/л) кінетик 6-бензинамінопурин (БАП). Фітогормони, які необхідні для органогенезу, та їх концентрація встановлюються індивідуально для кожної рослини [15]. Як активатори росту у живильних середовищах використовують кокосове молоко, дріжджі та картопляні екстракти, гідролізат казеїну та ін. Р.Р.Асфаніярова та інші [1] встановили, що калюсоутворення прискорюється у разі додавання до середовища Мурасіге та Скуга картопляного екстракту.

Для успішного проведення досліджень та отримання рослин-регенерантів є дотримання умов культивування. Залежно від особливостей мікроклімату можно стимулювати розвиток пазушних, адвентивних бруньок і пагонів безпосередньо з екстракту або калюсу. За загальноприйнятими методиками вирощування повинно здійснюватись у спеціальних кліматичних камерах, де підтримуються необхідні умови культивування: температуру 22-25˚С, відносну вологість повітря 70%; 16-годинний фотоперіод та освітлення інтенсивністю 4-5 тис.лк.

Завершальним етапом мікроклонального розмноження є поетапна адаптація рослин-регенерантів до субстрату та умов вікритого грунту.

Запорукою успішного адаптування регенерантів до умом in vivo е ретельний підбір субстрату, сприятливих умов в періоду загартування рослин [10].

Індійські вчені запропонували надійних метод унеможливлення зневоднення листя регенерантів під час їх адаптації до польових умов. Суть його полягає в обприскуванні рослин упродовж всього акліматизаційного періоду 50%-м розчином гліцерину, парафіну або жиру в діетиловому ефірі (1:1). Застосування даного методу дозволяє досягнути 100% їх приживлюваності у відкритому грунті. При цьому сприятливим терміном висаджування рослин у відкритий грунт є квітень-червень.

Висновок. Сучаний розвиток лісового господарства потребує впровадження новітніх технологій для збереження цінних лісових насаджень. Тому виникає необхідність у встановленні можливості їх відтворення шляхом отримання садивного матеріалу зі стійких дерев *in vitro* та його адаптації в *in vivo*. Широке запровадження мікроклонального методу розмноження деревних рослин, що тяжко розмножуються, дозволить значно збільшити обсяги виробництва якісного, безвірусного садивного матеріалу для задоволення власних потреб. У цьому контексті особливо актуальним є проведення досліджень, спрямованих на вивчення видових особливостей мікроклонального розмноження, адаптування рослин-регенерантів та вирощування садженців для подальшого створення лісових культур.

Література

1. Асфандиярова Р. Р. Каллусообразующая способность эксплантов из незрелых зародышей Гороха посівного // Межвузовский сборник: Актуальне вопросы биотехнологии. – УФА, 1990. – С. 60-64.

2. Баленда А.В. Вплив генотипу на спадковості мікроклонального розмноження представників підродини Prunoidae 2000: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.15 «Генетика». – К., 2000. – 17 с.

3. Бугар І.О. Індукований морфогенез і клональне мікророзмноження перспективних сортів м’яти: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд.. біол.. наук.: спец 03.00.20 «Біотехнологія». – Ялта, 2006. – 20 с.

4. Быченкова Э.А. Активность камбия и паренхимы тканей отрезков ветвей древесных растений в культуре in vitro: автореф. дис. на стиск. уч. степени док. боилог. наук. / Э.А. Быченкова. – Л, 963. – 15 с.

5. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наук. Думка, 2005. – 243 с.

6. Латушкіна Т.М. Клонільне мікророзмноження і оздоровлення лаванди in vitro: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с/г наук: спец 06.01.14 «Насінництво». – Сімферополь, 2006. – 21 с.

7. Лукічова Л.О. Біотехнологічні прийоми оздоровлення і клонального розмноження вишні (Cerasus vulgaris Mill.) і сливи (Prunus domestica L.) у Криму: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец 03.00.20 «Біотехнологія». – Ялта, 2004. – 21 с.

8. Матеріали проміжного звіту за договором №2М/ 136-2001, від 5 червня 2001 EUROFOREST: «нові технології, орієнтовані на перехід європейського лісового сектору на засади сталого розвитку» І етап. Харків: УкрНДІЛГА. – 2001. – 50 с.

9. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. – К.: ПоліграфКонсалдинг, 2003. – 520с.

10. Методика мікроклонування селекційних зразків моркви. Методичні вказівки / О.Ф.Сергієнко та ін. – УААН, Ін-т овочівництва і баштанництва УААН. – Мерефа: ІОБ УАН, 2004. – 12 с.

11. Методичні рекомендації для мікроклонального розмноження деревних та трав'янистих рослин. – К.: НАУ, 2003. – 40 с.

12. Мусієнко М.М., Панюта О.О. Біотехнологія рослин. Навчальний посібник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. – 114 с.

13. Пінчук А.П. Особливості адаптації рослин-регенерантів гібриду тополі сірої×тополі білої (Populus canescens Sm. × Populus alba L.)// Науковий вісник НАУ. – 2004. - №70 – с. 128-132.

14. Полевой В.М. «Физиология растений». Пособия для высших учебных заведений. / В.М. Полевой . – М.: Знание, 1993. – 270 с.

15. Саркисян Э.Д. Научные основы биотехнологии производства посадочного материала декоративных техниченских и других растений в условиях гидропоники и культуре in vitro : автореф. на соискание уч. степени докт. биол. наук: спец. 03.00.14 «Антропология». – А., 2001. – 50 с.

16. Сікач В.О. Вивчення особливостей впливу компонентів поживного середовища на рослинні експланти Syevia rebaudiana Bertoni в умовах in vitro: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец 03.00.12 «Фізіологія рослин» . – К., 1996. – 21 с.

17. Сорокина И.К., Старичкова Н.И. , Решетникова Т.Б., Гринь Н.А. Основы биотехнологии растений. Культураллу клеток растений: Уч пособие.

18. Таразский государственный педагогический институт (Научная и инновационная деятельность) Электронный ресурс/ Н.В.Ромаданова. особенности введения яблони в культуру in vitro. - Режим доступу: www.tarmpi.kz/nich/n publ/ig25/5/7 romanova.doc .

19. Ewald D., Naujoks G., Schneck V. Micropropagation of fast growing tree species as possible alternatives for agriculture Poznan/ Polen, 07. – 08.09.2005.

20. Scaltsoyiannes A. Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (Juglans regia)/ A. Scaltsoyiannes, P. Tsoulpha, K.P.Panrtsos, D.Moulalis// Silvae Genetica. – 1997. – V. 46. – №6. – P.326 – 332.