
УДК 630*181*5/674.031.635.12

Аспір. О.І. Захарчук¹ –

Житомирський національний агроекологічний університет

РОЗМНОЖЕННЯ В'ЯЗА ГЛАДЕНЬКОГО (*ULMUS LAEVIS PALL.*) *IN VITRO*

Досліджено метод розмноження рослин *Ulmus laevis Pall.* в умовах культури *in vitro*. Проаналізовано залежність морфогенної активності та органів від гормонального складу живильних середовищ. Підбрано оптимальні живильні середовища для розмноження в умовах стерильної культури. Дослідження впливу фітогормонів на морфогенні реакції *Ulmus laevis Pall.* показало, що для індукції мікроклонування та ризогенезу важливі як концентрації регуляторів росту, так і їх співвідношення у субстраті.

Ключові слова: *Ulmus laevis Pall.*, *in vitro*, живильне середовище, експланти, морфогенез, ризогенез.

¹ Наук. керівник: проф. А.Ф. Гойчук, д-р с.-г. наук – НУ біоресурсів і природокористування, м. Київ

Вступ. В'яз гладенький – це цінна деревна порода, що має міцну декоративну деревину, його широко використовують в озелененні населених пунктів та у поле захисному розведенні для закріплення ярів, балок та відвалів [2], а також відзначається відомими лікарськими властивостями (протизапальною, антибактеріальною, в'язучою, тонізуючою, ранозагоювальною та кровоспинною). Їльмові ліси мають високу промислову цінність, водоохоронне та водорегулятивне значення. Але ресурси цього виду надзвичайно обмежені і не відтворюються в таких об'ємах, як цього вимагає лісівнича практика. Природній ареал їльмових поступово скорочується та значно зменшується їх участь в лісових насадженнях. цьому зменшенню значно сприяли спалахи голландської хвороби їльмових, а також таке скорочення пов'язане з діяльністю людини.

Мікроклональне розмноження – ефективний спосіб збереження генотипів зрілих дерев, які є потенційно стійкими до голландської хвороби.

Необхідність масового відтворення генетично покращених форм деревних рослин за допомогою культури тканин для збільшення якісного складу лісонасаджень за рахунок отримання клонованих рослин, стійких до хвороб та шкідників, стресових та техногенних факторів може прискорити відтворення лісових ресурсів, дасть змогу отримати генетично покращений матеріал значно раніше, ніж у звичайних умовах. Стратегія, розроблена для в'яза гладенького, сприяє довготерміновому збереженню елітних генотипів, а також забезпечує підхід до покращання збереження інших порід, які знаходяться під загрозою зникнення.

Відтворення в'язів у культурі *in vitro*, зокрема в'яза американського, практикують в Канаді, США, Китаї [13-18, 23]. Mukund R. Shukla та ін. [23] у своїх дослідженнях широко використовують живильні середовища MS (Murashige T., Skoog F. 1962), WPM (MacCown, Lloyd 1981), DKW (Driver and Kuniyuki 1984) [21, 22]. Отже, закордонна практика вказує на доцільність використання культури *in vitro* для отримання садивного високопродуктивного садивного матеріалу в'яза гладенького. Водночас, відомо, що регенерація *in vitro* – це складний для відтворення генотипозалежний процес [1, 6, 9].

Мета дослідження. Розробити технології мікроклонального розмноження в'яза гладенького з метою практичного використання для збереження та відтворення його в природних умовах.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження виконували на базі лабораторії селекції, біотехнології та мікроклонального розмноження хмелю Інституту сільськогосподарства Полісся НАН України.

Для забезпечення максимальної генетичної стабільності клонованого матеріалу і з метою уникнення появи аномальних рослин як вихідний експлант використовують молоді, слабо диференційовані тканини. Експланти отримували як безпосередньо із навколишнього середовища, так і шляхом активації меристем у контрольованих умовах лабораторної кімнати ($t=24^{±2}^{\circ}\text{C}$, відносна вологість повітря 60-70 %). Антисептики та режим стерилізації підбирали експериментально [3].

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 у складі живильного середовища [6, 10, 12]. З метою визначення найоптимальнішого сере-

довища з погляду найбільшої відповідальності до умов органогенезу і росту в'яза гладенького в наших дослідах ми використовували живильні середовища, які характеризувались різними співвідношеннями мікро- та мікроелементів. Культивування здійснювали на середовищах WPM та MS [21, 22]. із цитокінінів у середовища додавали 6-бензиламінопурин, із ауксинів – 3-індолілмасляну кислоту та нафтицилоцтову кислоту, вітаміни, мезоінозит (100 мг/л), сахарози (25 г/л) а також активоване вугілля. Як гелуючі агенти використовували агар (6 г/л). Усі середовища мали pH 5,7-5,8. Пасажування на свіже живильне середовище проводили через 25-30 діб. Культивування експлантів відбувалося у кімнаті з кондиціонованим повітрям на скляних стелажах за температури $25^{±1}^{\circ}\text{C}$, відносної вологості повітря 70-75 %, фотоперіоду 16 годин і штучного освітлення інтенсивністю 3-5 тис. люкс. посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища готували згідно із загальноприйнятими методиками [4, 5, 11].

Результати дослідження. Внаслідок експерименту найпридатнішим матеріалом для введення в культуру *in vitro* виявилися штучно пробуджені бруньки. Вони дуже добре піддавалися стерилізації та характеризувалися значним морфогенним потенціалом. Здерев'янілий матеріал мав практично 100 %-ве зараження патогенною мікрофлорою. Розроблена схема досліджень та достатня кількість зразків дали змогу встановити не тільки ефективну концентрацію розчинів стериліантів, але й необхідну тривалість у часі оброблення експлантів. Аналіз кількості стерильних та інфікованих експлантів показав, що найменш ефективним стерилізатором виявився гіпохлорид натрію. Внаслідок його застосування (рис. 1) отримали 2,9-10,6 % стерильних експлантів.

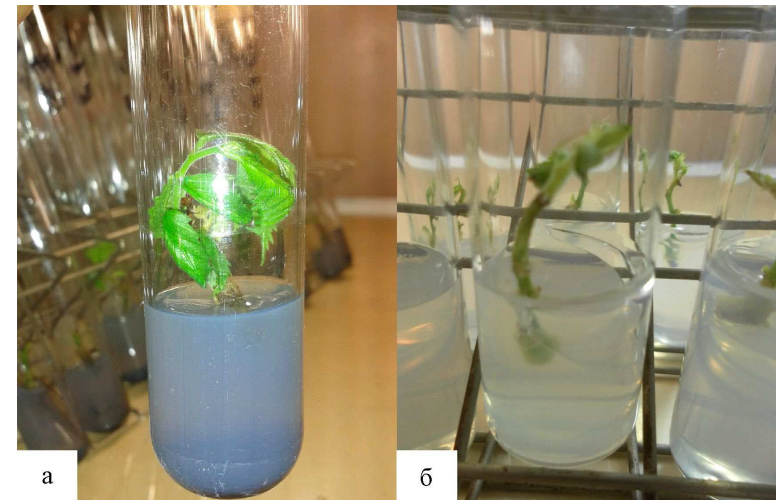


Рис. 1. Утворення мікроагонів на експлантах *Ulmus laevis* Pall. в умовах *in vitro*: а) середовище MS; б) середовище WPM

Тому подальше використання цього стериліанту вважаємо недоцільним. Після дії нітрату срібла цей показник варіює в межах 8,5-31,2 % залежно від концентрації та експозиції (рис. 2). Внаслідок поверхневої стерилізації 0,2 % дихлориду ртуті впродовж 4 хв отримано найбільша частка стерильних

життєздатних експлантів *Ulmus laevis* Pall. (77,1 %). Необхідно зазначити, що зі збільшенням часу стерилізації $b \leq$ хв. спостерігали різке збільшення кількості некротизованих експлантів.



Рис. 2. Процес ризогенезу *Ulmus laevis* Pall. в умовах *in vitro*

На всіх варіантах середовищ через три тижні було відзначено індукцію регенерації пагонів, однак інтенсивність проліферації до кінця субкультування була різною і залежала від концентрації регуляторів росту в живильному середовищі. У кращих варіантах з оптимально підібраним співвідношенням фітогормонів, які відіграють основну роль у регуляції росту, впродовж місяця спостерігали прямий морфогенез, за якого внаслідок активації меристемних тканин відбувалось формування нових пагонів, що відрізнялись швидким ростом.

Активний ріст пагонів спостерігали як на середовищі MS, так і на WPM. Вміст БАП в середовищах варіював у межах 0,5-2,0 мг/л. Встановлено, що низькі концентрації 6-БАП стимулювали швидкий ріст пагонів, які через місяць сягали 2-3 см. Найвагоміші результати отримано на середовищі MS з додаванням 1,5 мг/л БАП та активованого вугілля (1 г/л) та середовищі WPM, до складу якого також входили фітогормони БАП (1,0 мг/л) та НОК (0,5 мг/л) (рис. 1). От-

римані мікропагони переносили на свіжі живильні середовища, збільшуючи кількість клонованих рослин.

Наступним етапом було укорінення рослин регенерантів. Пасажування отриманих мікропагонів здійснювали на середовищах WPM та MS із повним та наполовину зменшеним складом мікро- та макросолей, а також із вмістом у них 3-ІМК в концентраціях 0,5-3,0 мг/л. Ініціацію ризогенезу відзначали в середньому через два тижні. Під час експерименту встановлено, що збіднення середовища, тобто зменшення вмісту макро- і мікросолей у складі сприяли швидшому вкоріненню експлантів. Найкращі результати отримано на варіанті середовища $\frac{1}{2}$ WPM+2,5 мг/л ІМК. явище ризогенезу спостерігали у 75 % експлантів (рис. 2).

Висновки. Отже, попередні дослідження дали змогу розробити підходи до мікроклонального розмноження в'язя гладенького (*Ulmus laevis* Pall.). основною причиною розроблення методів є необхідність індивідуального добору живильного середовища для культивування різних експлантів на кожному наступному етапі мікроклонального розмноження. Оптимальним варіантом середовища, що забезпечує повну реалізацію морфогенетичного потенціалу експланту з утворенням укорінених рослин, є $\frac{1}{2}$ WPM+2,5 мг/л ІМК.

Дослідження органогенезу в умовах *in vitro* та методів укорінення одержаних пагонів для подальшої адаптації рослин до умов *in vivo* тривають.

Література

1. Бутова Г.П. Использование методов культуры ткани для размножения и генетического улучшения лесных древесных растений / Г.П. Бутова, Т.М. Табацкая, Л.Л. Скробова // Генетика и селекция в лесоводстве. – 1991. – С. 41-49.
2. Гордієнко М.І. Лісові культури / М.І. Гордієнко, М.М. Гузь, Ю.М. Дебринюк, В.М. Мауер. – Львів : Вид-во "Камула", 2005. – 608 с.
3. Захарчук О.И. Особенности асептической культуры ильмовых / О.И. Захарчук // Сельское хозяйство и агропромышленный комплекс на рубеже веков : матер. МНК. – Новосибирск : Изд-во ЦНРС, 2013. – С. 26-32.
4. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – К. : Изд-во "Наук. думка", 1980. – 487 с.
5. Кунах В.А. Биотехнология лекарственных растений. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К. : Вид-во "Логос", 2005. – 730 с.
6. Кушнір Г.П. Мікклональне розмноження рослин, теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К. : Вид-во "Наук. думка", 2005. – 270 с.
7. Мельничук М.Д. Биотехнология растений : підручник [для студ. ВНЗ] / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К. : Вид-во "Поліграфконсалтинг", 2003. – 520 с.
8. Мельничук М.Д. Практикум з біотехнології рослин / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, А.А. Клопаденко, А.П. Пінчук. – К. : Вид-во НАУ, 2005. – 137 с.
9. 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.
10. Шестибратов К.А. Перспективы использования технологии клонального микро размножения в лесном хозяйстве ценных генотипов древесных растений / К.А. Шестибратов, А.И. Мирошников // Биотехнология. – Пушчино, 2006. – С. 106-111.
11. Anna M-S., Mariella L., Lorenzo M. 1998. Elm tissue culture: micropropagation of clones resistant to Dutch Elm Disease. Acta Hort. – Vol. 457. – Pp. 235-242.
12. Biroščíková M., Spišáková K., Lipták Š., Pichler V., Đurkovič J. 2004. Micropropagation of mature wych elm (*Ulmus glabra* Huds.). Plant Cell Rep. – Vol. 22(9). – Pp. 640-644 CrossRef, Medline.
13. Chanon, A.M., Kamalay, J.C., and Jourdan, P. 1997. Micropropagation of juvenile and mature American Elms from stem nodal sections. In 11th Central Hardwood 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.
14. Conde P., Sousa A., Costa A., Santos C. 2008. A protocol for *Ulmus minor* Mill. micropropagation and acclimatization. Plant Cell Tissue Organ Cult. – Vol. 92(1). – Pp. 113-119 CrossRef.

17. Durzan DJ., Lopushanski SM. 1975. Propagation of American elm via cell suspension cultures. Can. J. For. Res. – Vol. 5(2). – Pp. 273-277 Abstract.

18. Eshita SM., Kamalay JC., Gingas VM., Yaussy DA. 2000. Establishment and characterization of American elm cell suspension cultures. Plant Cell Tissue Organ Cult. – Vol. 61. – Pp. 245-249 CrossRef.

19. Fenning TM., Gartland KMA., Brasier CM. 1993. Micropropagation and regeneration of English Elm, *Ulmus procera* Salisbury. J. Exp. Bot. – Vol. 44(7). – Pp. 1211-1217 CrossRef.

20. Fink CVM., Sticklen M., Lineberger RD., Domir SC. 1986. *In vitro* organogenesis from shoot tip, internode, and leaf explants of *Ulmus* × 'Pioneer'. Plant Cell Tissue Organ Cult. – Vol. 7(3). – Pp. 237-245 CrossRef.

21. 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. – Vol. 39(1). – Pp. 27-36 CrossRef.

22. 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. – Pp. 453.

23. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, № 2/3. – Pp. 473-497.

24. Mukund R. Shukla. *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, № 4/4. – Pp. 686-697.

Зahарчук О.И. Размножение вяза гладкого (*Ulmus laevis* Pall.) *in vitro*

Исследован метод размножения растений *Ulmus laevis* Pall. в условиях культуры *in vitro*. Проанализирована зависимость морфогенной активности тканей и органов от гормонального состава питательных сред. Подобраны оптимальные питательные среды для размножения в условиях стерильной культуры. Исследования влияния фитогормонов на морфогенные реакции *Ulmus laevis* Pall. показали, что для индукции микроклонования и ризогенеза важны как концентрации регуляторов роста, так и их соотношение в субстрате.

Ключевые слова: *Ulmus laevis* Pall., *in vitro*, питательная среда, экспланты, морфогенез, ризогенез.

Zaharchuk O. Reproduction of elm (*Ulmus laevis* Pall.) *in vitro*

Investigated by the method of reproduction plants *Ulmus laevis* Pall. in culture conditions *in vitro*. The dependence of the morphogenesis activity of tissues and organs of the hormonal compositions of nutrient mediums. Optimal nutritious mediums were pick out multiplication in sterile culture conditions. Investigation of the phytohormonal influence on the *Ulmus laevis* Pall. morphogenesis showed that as the concentrations of growth regulators so as their correlation are important.

Keywords: *Ulmus laevis* Pall., *in vitro*, nutrient medium, explants, morphogenesis, ryzogenesis.