

УДК 630* 165.44: 161.443.6

М. М.ГУЗЬ¹, Р. М.ГРЕЧАНИК², В. Ф.ГЕВАЛ³**ОСОБЛИВОСТІ РОЗМНОЖЕННЯ IN VITRO ГІРКОКАШТАНА ЗВИЧАЙНОГО**

Представлено результати досліджень мікроклонування гіркокаштана звичайного в лабораторії лісової генетики (НЛТУ України, м.Львів). Як експлантанти використали насінини, апікальні та латеральні бруньки сіянців. Антисептики та режими стерилізації підбирали експериментально для кожного типу експлантантів окремо. Морфогенез ініціювали на середовищі Р-24з відповідним набором мінеральних компонентів, вітамінів та регуляторів росту. Окреслено перспективні напрямки подальших досліджень.

Вступ

Гіркокаштан звичайний – цінна лісова та декоративна деревна порода, яка набуває все більшого промислового застосування. Але ресурси цього виду надзвичайно обмежені і не відтворюються в таких обсягах, як цього потребує лісівнича практика. Проблема відтворення ускладнюється і тим, що плодоношення за останні роки надзвичайно погіршилося у зв'язку з пандемією мінулої молі, а вегетаційне розмноження не досить ефективне. Тому потрібно розробити цілком новий підхід до вирішення проблеми розмноження гіркокаштана.

На нашу думку, одним із можливих шляхів вирішення цієї проблеми є застосування методу культури тканин. Метод культури тканин – це спосіб розмноження тканин як рослинного, так і тваринного походження у штучному середовищі за умов цілковитої стерильності. Завдяки спеціально підбраному складу живильного середовища і, особливо, застосуванню специфічних гормонів росту ми можемо впливати на морфогенез і хід розвитку рослин, ступінь намноження [1]. Але у гіркокаштана перебіг цих процесів досить специфічний і мало вивчений [3].

Тому метою нашої роботи було опрацювання методик і виконання експериментальних досліджень з мікроклонування гіркокаштана звичайного, яке має низку переваг над іншими методами розмноження: отриманий садивний матеріал генетично ідентичний вихідній рослині; розмноження цінних клонів рослин здійснюють на невеликих площах, з меншими затратами електроенергії і праці; істотно скорочуються терміни розмноження цінних клонів, що важливо для багаторічних деревних рослин, особливо – цільових господарсько-цінних генетично трансформованих форм: стійких до дії мутагенів, з високою резистентністю до несприятливих стресових чинників, хвороб і шкідників, із підвищеною енергетикою росту й розвитку, обміну речовин тощо; отримують велику кількість вегетативного потомства рослин, що важко розмножуються

у звичайних умовах; є можливість розмноження сіянців без виведення їх із ювенільної фази; є можливість довготермінового зберігання (кріозбереження) пробіркових рослин за низьких температур, що дасть змогу створити "банк" цінних форм рослин; отримують оздоровлений матеріал від заражених нематодами, бактеріями і вірусами рослин; значно зростають коефіцієнти розмноження, що за розрахунками досягають 10^5 - 10^6 клонів за рік, тоді як традиційно за цей самий термін від однієї рослини одержують 5-100 шт.; отримують шлях до покращення та селекції згаданих клонів (експериментальний мутагенез та розхимерювання); є можливість вивчення індивідуальної генетики культур, що розмножуються насінням; є можливість розроблення технології масового і безперервного одержання "штучного" насіння; є можливість створювати штучні сорти тощо.

Матеріали і методи

Джерелом експлантантів були насінини та молоді пагони з бічними і верхівковими бруньками. У процесі роботи найбільш вдалими виявився вибір бруньок як експлантантів. Під ламінаром з бруньок вищелювали покривні лусочки і вищелювали меристемний купол розміром близько 2мм. Термінальні бруньки звільняли від молодих листочків, а з латеральних бруньок молоді листочки не видаляли. З ендосперму насінин вищелювали зародки.

В експерименті випробовували декілька варіантів стерилізації експлантантів. Але спершу сегменти промивали у проточній воді з додаванням детергенту, потім почергово занурювали їх в дезінфікуювальні розчини гіпохлориту кальцію, перекису водню, фундазолу, етилового спирту, "Білизни", а після закінчення стерилізації промивали стерильною дистильованою водою.

Інструменти (скальпелі, пінцети) і посуд (чашки Петрі, мірні склянки, колби, пробірки) стерилізували за температури 180°C 30-60хв. Дистильовану воду стерилізували в автоклаві за температури 120°C і тиску 1,0-1,2атм.

¹ Микола Михайлович ГУЗЬ – дійсний член ЛАН України, доктор сільськогосподарських наук, професор, Національний лісотехнічний університет України. Україна, м. Львів. Тел. моб.: 8-050-31-52-312.

² Руслан Мар'янович ГРЕЧАНИК – кандидат сільськогосподарських наук, доцент, Національний лісотехнічний університет України. Україна, м. Львів. Тел. моб.: 8-067-255-2882. E-mail: rugrech@gmail.com

³ Володимир Федорович ГЕВАЛ – інженер лісового господарства, здобувач кафедри лісових культур і лісової селекції, Національний лісотехнічний університет України. Україна, м. Львів. Тел. моб.: +38-067-352-27-95.

З метою визначення найоптимальнішого середовища з точки зору найбільшої відповідності до умов органогенезу і росту гіркокаштана в наших дослідках ми використовували живильні середовища, які характеризувалися різними співвідношеннями мікро- і макроелементів. Культури вирощували на таких середовищах: модифіковане середовище MS-1, середовище Р-24 для листяних деревних порід (табл.1).

Табл.1. Склад основних живильних середовищ

Компоненти	MS-1, мг/л	Компоненти	Р-24, мг/л
Макроеlementи		Макроеlementи	
KNO ₃	1900	KNO ₃	253
NH ₄ NO ₃	1650	Ca (NO ₃) ₂ × 4H ₂ O	661
CaCl ₂ × 2H ₂ O	440	K ₂ SO ₄	436
MgSO ₄ × 7H ₂ O	370	KH ₂ PO ₄	408
KH ₂ PO ₄	170	Mg (NO ₃) ₂ × 6H ₂ O	192
Органічні речовини		NH ₄ H ₂ PO ₄	144
Міоїнозитол	100	Органічні речовини	
Тіамін-HCl	0,1	Міоїнозитол	100
Нікотинова к-та	0,5	Тіамін-HCl	0,1
Піридоксин-HCl	0,5	Нікотинова к-та	0,5
Гліцин	2,0	Піридоксин-HCl	0,5
Мікроelementи		Аргінін-HCl	500
H ₃ BO ₃	6,2	Мікроelementи	
MnSO ₄ × H ₂ O	22,3	NaCl	5,8
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8,6	H ₃ BO ₃	7,44
KI	0,75	MnSO ₄ × H ₂ O	3,38
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,25	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	11,5
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,25	KI	0,6
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,02	Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,0425
Носії заліза		CuSO ₄ × 5H ₂ O	2,5
Na ₂ EDTA × H ₂ O	37,3	CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,05
FeSO ₄ × 7H ₂ O	27,8	NiCl ₂ × 6H ₂ O	0,0476
		Носії заліза	
		Na ₂ EDTA × H ₂ O	42,35
		FeSO ₄ × 7H ₂ O	27,8
Оптимальне pH=5,7		Оптимальне pH=5,75	

З метою вивчення дії різних регуляторів росту ми проаналізували дію БАП* (6-бензиламінопурину), НОК** (нафтилоцтової кислоти), ІМК*** (індолілмасляної кислоти) та кінетин у різних концентраціях і поєднаннях на процеси морфогенезу пагонів і ризогенезу.

Результати досліджень

Підбір експлантантів. Джерелом експлантантів були насіння гіркокаштана звичайного та молоді пагони з бічними і верхівковими бруньками 2-3-місячних та 1-2-річних сіянців. Використання сегментів і цілих зародків насіння та бруньок 1-2річних сіянців гіркокаштана виявилось неефективним з огляду на сильну зараженість їх епіфітною мікрофлорою (98% експлантантів загинули). У процесі роботи найбільш вдалим виявився вибір в ролі експлантантів бруньок 2-3-місячних сіянців, вирощених з насіння в умовах лабораторії (рослини менше заражені фітопатогенними організмами, ніж у природних умовах) за тьмяного освітлення (у тканинах не утворюються феноли, які пригнічують ріст висаджених на середовище експлантантів).

Стерилізація. Важливим і складним моментом в клональному мікророзмноженні є одержання стерильного вихідного матеріалу, тому що поверхневі тканини органів рослин заражені епіфітними бактеріями, грибами та їх спорами. Правильний вибір стерилізувальної речовини полягає в тому, щоб нейтралізувати епіфітну мікрофлору і не пошкодити тканину рослини. Крім цього, дезінфікувальна речовина повинна добре змиватися і не проникати у тканину рослини. Тому режим стерилізації треба підбирати експериментально для кожної рослини і для кожного органу окремо.

Послідовність підбору концентрації стерилізувальних агентів і тривалість стерилізації для експлантантів гіркокаштана звичайного представлено у табл.2.

Табл.2. Підбір концентрації дезінфікувальних агентів, послідовності і тривалості стерилізації експлантантів

Етапи	Діюче середовище	Тривалість оброблення
Варіант 1		
Промивання	проточна вода з детергентом	2,5год.
Оброблення	96% етанол	5...7сек.
Оброблення	0,5% фундазол	30хв.
Оброблення	1% AgNO ₃	20хв.
Промивання	стерильна дистильована H ₂ O	триразове
Варіант 2		
Промивання	проточна вода з детергентом	2,5год.
Оброблення	70% етанол	3...5сек.
Оброблення	0,5% фундазол	30хв.
Оброблення	10% H ₂ O ₂	10хв.
Промивання	стерильна дистильована H ₂ O	триразове
Варіант 3		
Промивання	проточна вода з детергентом	2,5год.
Оброблення	33% "Білизна" (NaClO ₃)	15хв.
Оброблення	70% етанол	3...5сек.
Оброблення	0,4% AgNO ₃	20хв.
Промивання	стерильна дистильована H ₂ O	триразове
Варіант 4		
Промивання	проточна вода з детергентом	2,5год.
Оброблення	0,5% фундазол	30хв.
Оброблення	10% H ₂ O ₂	10хв.
Промивання	стерильна дистильована H ₂ O	триразове
Варіант 5		
Промивання	проточна вода з детергентом	2,5год.
Оброблення	0,5% фундазол	30хв.
Оброблення	7% Ca(ClO) ₂	20хв.
Промивання	стерильна дистильована H ₂ O	триразове

Примітка: після кожного оброблення окремим дезінфікувальним агентом експлантанти 3-5разів промивали дистильованою водою.

Результати, отримані внаслідок випробування різних методів стерилізації експлантантів гіркокаштана звичайного, представлено в табл.3.

Найкращих результатів було досягнуто внаслідок застосування такої послідовності оброблення експлантантів:

- промивання у проточній воді з додаванням детергенту – 2,5год.;
- промивання у дистильованій воді 3-5разів;
- оброблення 33% "Білизною" (NaClO₃) – 15хв.;

* – цитокінін, що є відносно досить активним, найдешевшим і єдиним, який можна автоклавувати. З цієї причини він є одним з найбільш вживаних, особливо в умовах комерційного мікророзмноження, де витрати і зручність в роботі ставляться на перше місце.

*** – часто використовують, як ауксини, тому що вони більш стабільні за

відношенням до світла і температури та їх дія подібна до дії ІОК (основний природний ауксин).

**** – значно повільніше розкладається автоклавуванням чи світлом, ніж ІОК.

- промивання в дистильованій воді 3-5разів;
- оброблення 70% етиловим спиртом (C_2H_5OH) – 3...5с;
- промивання в дистильованій воді 3-5разів;
- оброблення 0,4% нітратом срібла ($AgNO_3$) – 20хв.;
- 3-разове промивання у стерильній дистильованій воді.

Табл.3. Підбір методів стерилізації для експлантантів гіркогоаштана звичайного

Висаджування	Варіант 1	Варіант 2	Варіант 3	Варіант 4	Варіант 5
	15шт.	15шт.	15шт.	15шт.	15шт.
Чистих через 7 днів	13 (0,05) (почорніння)	7 (0,03)	11 (0,04)	7 (0,03)	2 (0,01)
Чистих через 14 днів	9 (0,04) (почорніння)	– (0,00)	11 (0,04)	– (0,00)	– (0,00)
Чистих через 21 день	9 (0,04) (почорніння)	– (0,00)	11 (0,04)	– (0,00)	– (0,00)

Примітка: у дужках вказана відносна частота виходу стерильного матеріалу.

Тільки така послідовна дезінфекція дає змогу отримати досить високу частку стерильного матеріалу. Застосування нітрату срібла в концентрації 0,4% виправдане як з погляду економії цього досить цінного реактиву, так і тому, що у вищих концентраціях він спричинює опіки і некроз тканин. Використання для стерилізації експлантантів гіркогоаштана звичайного розчинів гіпохлориту кальцію, фундазолу, перекису водню та антибіотиків було неефективним.



Рис.1. Морфогенез гіркогоаштана звичайного in vitro

Ініціація в умовах in vitro. Експлантанти були ізолювані зі стерильного матеріалу та перенесені в пробірки, в яких вже було середовище Р-24та модифіковане середовище MS-1, з відповідним набором мінеральних компонентів та вітамінів, 50мг/л Na-Fe-EDTA, 2%

сахарози та 0,8% агар-агару. Як регулятор росту використовували БАП і кінетин у концентраціях від 0,2до 1,0мг/л.На середовищі Р-24спостерігали ініціацію морфогенезу (рис. 1). Через 4-6тижнів після ініціації пагони потрібно поділити на верхівки пагонів та сегменти вузлів і надалі використовувати для пасажування щочотиритижні на базовому середовищі Р-24з додаванням 0,2-1,0мг/л БАП і кінетину.

Висновки

Наведені вище результати експериментальних досліджень мікроклонального розмноження гіркогоаштана звичайного засвідчили їх достатню ефективність. Найкращого результату було досягнуто внаслідок використання як експлантантів апікальних і латеральних бруньок двомісячних сіянців. Підібрано оптимальний режим стерилізації експлантантів, який є недорогим і дає високий відсоток виходу стерильних рослин. Оптимальним середовищем для ініціації морфогенезу було середовище Р-24з відповідним набором мінеральних компонентів та вітамінів, 50мг/л Na-Fe-EDTA, 2% сахарози та 0,8% агар-агару.

У майбутньому потребує подальшого вивчення кількісне та якісне різноманіття гіркогоаштана звичайного з метою проведення генетико-селекційної роботи з декоративними формами. Дослідження поліморфізму за всіма ознаками треба здійснювати на основі методів порівняльної генетики. Ми запланували здійснення фенологічних, морфолого-анатомічних, фізіолого-біохімічних досліджень, гібридизації та каріологічний аналіз цих деревних рослин. Зокрема, з метою отримання цінного селекційного матеріалу і мутантних форм із господарсько-цінними ознаками потрібно вивчити вплив хімічних і фізичних мутагенних чинників на процес мікроклонального розмноження.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Биотехнология растений:** культура клетки. – М.: Агропромиздат, 1989. – 280с.
2. **Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В.** Технология микроклонального размножения растений. – К.: Наук. думка, 1992. – 267с.
3. **Chalupa V.** In vitro propagation of Larix, Picea, Pinus, Quercus, Fagus and other species using adenine-type cytokinins and thidiazuron// Coomun Inst. For Czech. – 1985. – 14. – P.65-90.

M. M.Guz, R. M. Hretchanyk, V. F.Heval

PECULIARITIES OF REPRODUCTION IN VITRO OF HORSE CHESTNUT EUROPEAN

The results of researches of microclonic propagation of horse chestnut European are presented ordinary in the laboratory of forest genetics (NUFWT of Ukraine, L'viv). In quality explantants utilized pip, upper (apical) and side (bosom or lateral) buds of seedlings. Antiseptics and modes of sterilization picked up experimentally for each to the type of explantants separately. Initiating a morphogeny on the environment of P-24with the proper set of mineral components, vitamins and regulators of growth. The perspective directions of investigation are projected.

