

УДК 630*

**ВПЛИВ МІНЕРАЛЬНОГО СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА І
ТИПУ ЦИТОКІНІНУ НА МОРФОГЕНЕЗ ОСИКИ (*POPULUS
TREMULA L.*) В УМОВАХ *IN VITRO***

С.Ю. Білоус, аспірантка*

Наведено особливості морфогенезу осики Populus tremula L. залежно від мінерального складу живильного середовища та концентрації цитокінінів в умовах in vitro

Ключові слова: мікроклональне розмноження, експлантат, живильне середовище, цитокініни, морфогенез, *in vitro*

Основою мікроклонального розмноження – є регенераційна здатність тотипотентних рослинних клітин [2]. 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 [5, 7, 9].

Першою роботою з вивчення дії фітогормонів як індуктора органогенезу в культурі калюсної тканини були роботи Скуга та ін. [10]. В дослідженнях з впливу фітогормонів ауксинів і цитокінінів на розвиток експлантів у культурі *in vitro* вони показали, що залежно від співвідношення гормонів у живильному середовищі спостерігалось утворення пагонів, коренів або калюсної тканини. При домінуванні в середовищі гормонів цитокінінного типу спостерігалось формування пагонів, надлишок ауксинів спричиняв ризогенез, при проміжному співвідношенні відбувалось утворення і проліферація калюсної тканини.

Тканини різних видів рослин відрізняються вимогами щодо конкретних концентрацій фітогормонів для індукції органогенезу. Напевно, основною причиною відмінностей морфогенезу *in vitro* при використанні екзогенних гормонів є наявність у тканинах ендогенних гормонів. Так, для тканин з високим вмістом цитокінінів додавання до середовища цитокінінів буде

призводити до інгібування розвитку бруньок і органогенезу. В такому випадку органогенез відбуватиметься за відсутності цитокінінів. Підтвердженням цього є робота Арнольда та Еріксона [11, 12].

Цитокініни – це регулятори росту, ефект від яких найбільший при застосуванні на культурах ізольованих тканин, в яких вони разом з ауксинами стимулюють поділ клітин і здатність до морфогенезу.

Нині ідентифіковано близько 15 природних цитокінінів (зеатин, зеатинрибозид, зеатинрибозидфосфат та ін.). В умовах *in vitro* широко використовують високоактивний синтетичний препарат 6-фурфуриламінопурин (кінетик), зеатин, бензиламінопурин (6-БАП) та тїдіазурон (ТДЗ) [5].

Цитокініни поліфункціональні у своїй дії на різних етапах росту і розвитку рослин. Вони стимулюють розвиток латеральних точок росту (бокових бруньок), тобто беруть участь у подоланні апікального домінування. Метод проліферації пазухових пагонів з бруньок є найпоширенішим у практиці мікроклонального розмноження різних видів рослин. Співвідношення регуляторів росту для кожної культури визначається експериментально [3, 4, 5].

Метою досліджень було вивчення впливу складу живильного середовища і типу цитокініну на морфогенез клітин, тканин та органів осики зеленокорої в умовах *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження. Досліди проводили на базі проблемної лабораторії фітовірусології та біотехнології рослин Національного університету біоресурсів та природокористування України. Матеріалом слугували мікроклони осики зеленокорої. Саме ця форма осики характеризується швидким ростом та є стійкою проти ураження серцевинною гниллю [8].

Як первинні експланти використовували пагони осики зеленокорої з бічними і апікальними бруньками. Відбір живців здійснювали у весняно-літній період від зовнішньо-здорових без фізіологічних відхилень дерев

осики. Для знешкодження екзогенної бактеріальної та грибової мікрофлори використовували 70%-вий розчин C_2H_5OH (30 с), 1%-вий розчин $AgNO_3$ (5-7 хв), 25%-вий розчин H_2O_2 (5 хв) та відмивали в стерильній воді (один раз 5-10 хв). Базовим живильним середовищем слугувало середовище за прописом Мурасіге і Скуга (МС), з повним і зменшеним на половину вмістом макро- та мікросолей [10]. Для масового мікроклонального розмноження осики методом активації вже існуючих у рослині меристем, використовували живильні середовища МС, Wood Plant Medium (WPM) та Драйвера (DKW) [5] з додаванням до їх складу різних груп цитокінінів 6-бензиламінопурину (6-БАП), тидіазурону (ТДЗ) та кінетину (6-фурфуриламінопурин) як окремо, так і комбінуючи між собою. Додатково до середовища додавали активоване вугілля ($1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$), сахарозу ($30 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$), мезоінозит ($100 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) та агар (0,7%), рН середовища 5,6-5,7 [1, 6].

Експлантати культивували при освітленні 3-4 тис. лк, температурі $24\pm 2^\circ\text{C}$ і вологості повітря 70% з 16 - годинним фотоперіодом. Результати експерименту оцінювали на 30-ту добу культивування в умовах *in vitro*.

Результати дослідження. Основним фактором МКР є отримання високого коефіцієнта розмноження. Головну роль при цьому грають фітогормони і синтетичні стимулятори росту та розвитку.

Для деревних культур синтетичний аналог цитокініну ТДЗ у низьких концентраціях ефективніший порівняно з традиційними похідними пуринів, що неодноразово підтверджено дослідженнями різних авторів [12, 13, 14].

На основі цих даних провели дослідження гормонального впливу 6-БАП, кінетину та ТДЗ на ріст та розвиток експлантів осики в культурі *in vitro* на ПС за прописом МС, DKW та WPM.

Експлантати, одержані на безгормональному середовищі МС, розділяли на сегменти, які формували верхівкову бруньку, одну чи дві листові пластинки та стебло розміром не більше 1 см і культивували їх на запропонованих нами живильних середовищах протягом 30 діб (таблиця).

Вплив концентрації цитокінінів на вітрифікацію та пагоноутворення
експлантів осики

ПС	Гормони			Довжина пагонів, см	Пагонів на експлант, шт.	Пагоноутворення, %	Вітрифікація, %
	БАП мг·л ⁻¹	ТДЗ мг·л ⁻¹	Кінетин мг·л ⁻¹				
МС 1*	-	0,2	-	2	1-2	80	-
МС 2*	-	0,4	-	3,5	3-4	75	-
МС 3*	-	0,5	-	3	2-3	98	-
МС 4*	-	0,6	-	3	1-2	90	-
МС 5*	-	0,8	-	6	1-2	95	-
МС 6*	-	1,0	-	4	2-3	87	-
МС 7*	-	1,5	-	3	1	10	-
МС 8*	-	2,0	-	4	1	10	-
МС 9*	-	2,5	-	2	1	30	-
МС 10	0,5	-	-	3	1	36	-
МС 11	1,0	-	-	3	1	25	20
МС 12	2,0	-	-	2	1	40	27
МС 13*	-	-	0,5	4	2-3	78	-
МС 14*	-	-	0,25	3	1-2	80	-
МС 15*	-	0,5	0,25	5	3-4	100	-
МС 16	1,0	-	0,25	3	1	15	10
DKW 17	0,5	-	-	3	1	28	-
DKW 18	1,0	-	-	2	1	5	38
DKW19	2,0	-	-	1	-	-	40
WPM 20	0,5	-	-	2	1-2	35	-
WPM 21	1,0	-	-	3	1	8	17
WPM 22	2,0	-	-	2	-	-	30

*ПС з додаванням 1 г·л⁻¹ активованого вугілля.

За даними експерименту додавання у високих концентраціях цитокініну 6-БАП – 1,0-2,0 мг·л⁻¹ негативно впливало на експлантати на всіх живильних середовищах, відзначали також ефект їх вітрифікації. На живильному середовищі МС-12 було зафіксовано 40% експлантів з ознаками вітрифікації.

Культивування експлантатів на середовищі з кінетином (0,25-0,5 мг·л⁻¹) спричиняло розвиток з меристем бруньок незначної кількості пагонів та додаткових бруньок, що характеризувались уповільненим розвитком (місячний приріст становив 0,5-1,0 см). Використання 0,25 мг·л⁻¹

кінетину з $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ТДЗ сприяло утворенню максимальної кількості пагонів на всіх експлантах.

У результаті проведених досліджень встановлено, що висока концентрація цитокініну ТДЗ, таких як $1,5\text{-}2,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, негативно впливала на експлантати. Спостерігали пригнічення їх росту, відсутність пагоноутворення (рис. 1. А). Експлантати мали вигляд стебла з бруньками, які не встигли розвинути у пагони, деякі рослини відзначались почервонінням листків та їх опаданням (рис. 1. Б). Це явище характерне при використанні тїдіазурону [13, 14] (рис.1).



А



Б

Рис. 1 Результат впливу високих концентрацій ТДЗ на експлантати осики зеленокорой в культурі *in vitro* (ПС МС-7, МС-8, МС-9)

Максимальний приріст рослин-регенерантів, збільшення кількості міжвузлів та формування потужної кореневої системи відзначали на живильному середовищі з додаванням $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ та $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ТДЗ. Найінтенсивніше пагоноутворення було на середовищі з додаванням низьких концентрацій гормонів цитокінінового типу $0,2\text{-}0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ТДЗ та $0,25 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ кінетину (ПС МС-1, МС-2, МС-3, МС-14, МС-15) (рис. 2).

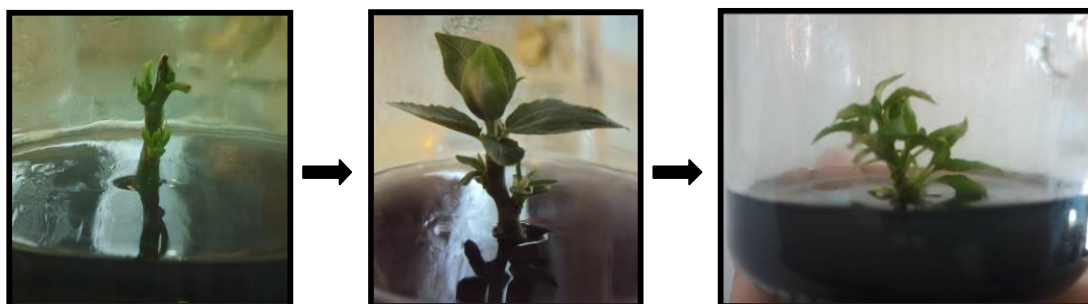


Рис. 2 Утворення мікропагонів на експлантатах осики

Populus tremula L.

Високу морфогенну здатність, що характеризувалась швидким ростом рослин у висоту, збільшенням кількості міжвузлів та формуванням потужної кореневої системи, відзначали на живильних середовищах МС-3, МС-5 МС-6 (рис.3).

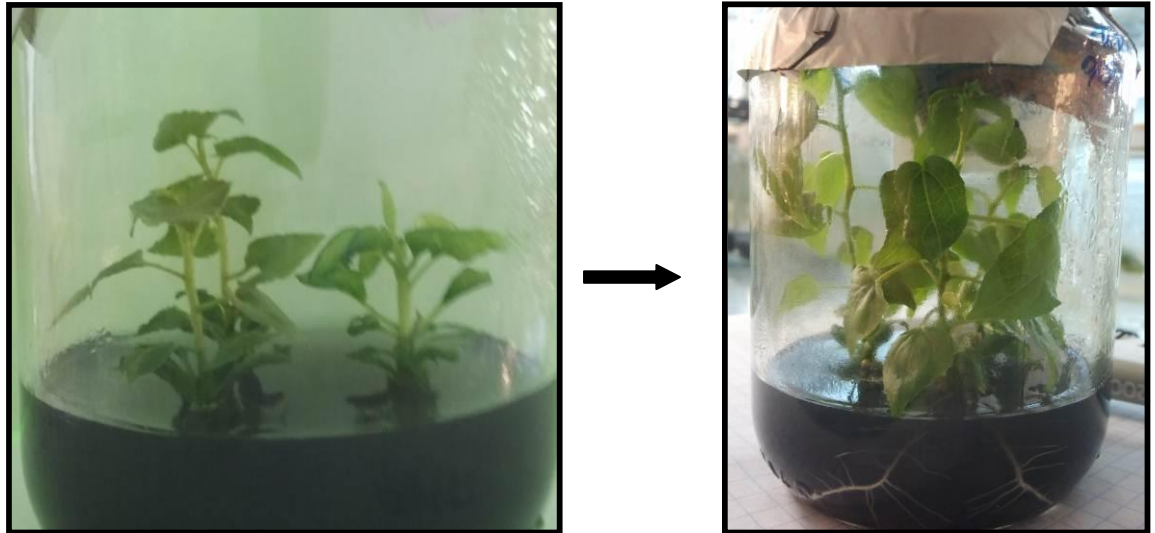


Рис. 3 Формування рослин-регенерантів з меристемних тканин осики зеленокорої *Populus tremula* L.

Явище вітрифікації не спостерігали в експерименті з використанням тїдіазурону.

Таким чином, попередні дослідження дозволили розробити підходи до мікроклонального розмноження осики зеленокорої. Основною причиною розробки методів є необхідність індивідуального добору живильного середовища для культивування різних експлантатів на кожному наступному етапі мікроклонального розмноження. Оптимальним є варіант використання живильного середовища з таким складом: $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ТДЗ+ $0,25 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ кінетину+ $1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ активованого вугілля та $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ТДЗ+ $1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ активованого вугілля, які забезпечують не тільки індукцію органогенезу, але повну реалізацію морфогенетичного потенціалу експлантату з утворенням укорінених рослин.

Дослідження органогенезу осики *Populus tremula* L. в умовах *in vitro* та методів укорінення одержаних пагонів для подальшої адаптації рослин та їх вирощування у відкритому ґрунті тривають.

Список літератури

1. Білоус С.Ю. Вплив тідазуруну на пагоноутворення осики (*Populus tremula* L.) в культурі *in vitro* / С.Ю. Білоус / Матер. міжн наук. практ. конф. молодих вчених «Актуальні проблеми наук про життя та природокористування» – К.: НУБіП України. – 2011. – С.68 – 68.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Калинин Ф.А. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.А. Калинин, В.В. Сарнацкая, Л.М. Полищук – К.: Наук. думка, 1980. – 290 с.
4. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко – М.: Наука, 1983. – 96 с.
5. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька – К.: Наук. думка, 2005. – 270 с.
6. Особливості морфогенезу осики зеленокорої (*Populus tremula* L.) при введенні в культуру *in vitro* / М.Д. Мельничук, С.Б. Ковалевський, А.А. Клюваденко, С.Ю. Білоус // Наук.вісник НУБіП України – 2011. – Вип. 164. – С. 272 – 278.
7. Мельничук М.Д. Практикум з біотехнології рослин / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, А.А. Клюваденко, А.П. Пінчук – К.: НАУ, 2005. – 137 с.
8. Цилюрник А. В. Некоторые данные о поражаемости сердцевинной гнилью разных форм осины / А.В. Цилюрник / Лесоводство и агролесомелиорация. –1965. – № 2. – С. 128–131.
9. Шестибратов К.А. Перспективы использования технологии клонального микроразмножения в лесном хозяйстве ценных генотипов древесных растений / К.А. Шестибратов, А.И. Мирошников / Биотехнология.-Пушино, 2006. – С. 106 – 111.

10. Murashige T. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures / T.Murashige, F. Scoog / *Physiol. Plant.* – 1962. – 15, №3. – P. 473 – 497.

11. Pijut P.M. Micropropagation of *Juglans cinerea* L. (Butternut) In: Bajaj, Y.P.S. *Biotechnology in agriculture and forestry – high-tech and micropropagation* – Berlin: Springer-Verlag, 1997. – V. 39. – P. 345–357.

12. Abo El-Nil M.M. Embriogenesis of gymnosperm forest tree / Patent N 4217730. – 1996.

13. Tsvetkov I. Thidiazuron-induced regeneration in root segments of white poplar (*P. alba* L.) / I. Tsvetkov, J-F Hausman, L. Jouve / *Bulg. J. Agric. Sci.* 13 – 2007 – 623-626 p.

14. Bhuiyan M.K.R. Effects of thidiazurone and benzyl amino purine on *in vitro* multiple shoot development in colocasia esculenta [(L.) Schott] cultivar “Bilashi” / Bhuiyan M.K.R., M.M. Hossain, M.J. Hossain, M. Zakaria / *Journal of root crops.* – 2009, Vol. 35, No. 2. – 143-147 p.

Влияние минерального состава питательной среды и типа цитокинина на морфогенез осины (*Populus tremula* L.) в условиях *in vitro*

Белоус С.Ю.

Приведены особенности морфогенеза осины *Populus tremula* L. в зависимости от минерального состава питательной среды и концентрации цитокининов в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: микрклональное размножение, эксплант, питательная среда, цитокинины, морфогенез, *in vitro*

Influence of mineral constitution of nutrition medium and type of cytokinin
on morphogenesis of *Populus tremula* L.

Bilous S.

*Features of morphogenesis of aspen depending on the mineral composition
on the nutrient medium and type of cytokinins concentration in vitro condition
were presented*

Key words: micropropagation, explant, nutrient medium, cytokinins,
morphogenesis, in vitro