

Рассмотрены биологические особенности репродуктивной регенерации стеблевых черенков сортов и форм фундука. Охарактеризованы факторы, влияющие на эффективность адвентивного процесса образования корней у стеблевых черенков в Правобережной Лесостепи Украины – сорт, форма, сроки черенкования, тип пагона, метамерность черенкового материала, влияние биологически активных веществ и др. Показано, что усовершенствование технологии стеблевого черенкования сортов и форм фундука может быть достигнуто путём индуцирования ризогенной активности стеблевых черенков биологически-активными веществами ауксиновой природы β -ИМК і КАНО.

Ключевые слова: сорта и формы фундука, стеблевые черенки, образование корней, метамерность черенка, тип черенка, биологически-активные вещества.

Biological peculiarities of reproductive renovation as for the stem grafts and forms of hazelnut are established. The factors influenced the efficiency of process of adventive root formation for the stem grafts in the Right Bank Forest Steppe Zone of Ukraine, such as – variety, form, term of cutting, shoot type, the merism of graft material, the impact of active agents and others are characterized. It is determined that the improvement of the stem cutting technology for sorts and forms of hazelnut should be reached through the induce of rizogeny activity of the stem grafts with the help of auxin character active agents β -indolebutyric acid and KANO.

Key words: hazelnut varieties and forms, stem cuttings, root formation, metamerically stem, stem type, biologically active substances

УДК 630*57.085.2:58.083.5

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ *POPULUS TREMULA* L.

С. Ю. Білоус, кандидат біологічних наук,
e-mail: forest_biotech@nubip.edu.ua

Встановлено особливості мікроклонального розмноження *P. tremula*. Досліджено способи отримання асептичної культури, індукції прямої регенерації тканин *P. tremula* залежно від генотипу, типу експланту та умов культивування *in vitro*. З'ясовано шляхи реалізації морфогенетичного потенціалу мікропагонів *P. tremula*. Встановлено оптимальні складові живильного середовища з додаванням 0,25-0,5 мг·л⁻¹ кінетину, тидіазурону та активованого вугілля, що забезпечили повну реалізацію морфогенетичного потенціалу експлантів з утворенням

укорінених рослин, можливістю довгострокового пасажування *P. tremula* в умовах *in vitro* та адаптації рослин до умов *ex vitro*.

Ключові слова: *Populus tremula* L., мікроклональне розмноження, поживне середовище, експлант, морфогенез, регулятори росту, плантаційне вирощування.

Вступ. Зменшення лісових ресурсів на фоні загального зростання потреб промисловості, сільського господарства та біоенергетики у якісній деревині зумовлюють збільшення попиту на швидкозростаючі деревні рослини. Одним із перспективних видів у цій категорії є тополя тремтяча, або осика (*Populus tremula* L.), яка характеризується швидким ростом та стійкістю деяких морфологічних форм проти збудників серцевинної гнилі. *P. tremula* має значний потенціал для вирішення сировинних, екологічних, енергетичних та рекреаційних проблем [4, 6].

Створення лісових плантацій *P. tremula* є одним із актуальних завдань сьогодення, що потребує наукового обґрунтування рослинних механізмів та встановлення морфогенних стимулів для одержання якісного садивного матеріалу *in vitro* [11]. З активним розвитком біотехнологій стає можливим прискорювати процес розмноження деревних рослин та отримувати за короткий час потрібну кількість оздоровленого і життєздатного садивного матеріалу [1, 2, 5, 10].

У природних умовах *P. tremula* може добре розмножуватися насінням, кореневими паростками, гірше – паростками від пенька, проте виробничники розмноження *P. tremula* насінням та живцями майже не практикують через низьку стійкість рослин деяких морфологічних форм проти патогенів та збудників серцевинної гнилі. Враховуючи виняткову важливість отримання генетично однорідного, оздоровленого садивного матеріалу для подальшого створення високопродуктивних деревостанів *P. tremula*, необхідно застосовувати біотехнологічні та молекулярні методи [4].

Мета досліджень – встановити особливості мікроклонального розмноження рослин *P. tremula* для масового отримання оздоровленого садивного матеріалу для подальшої адаптації до умов *ex vitro*

Матеріали і методика досліджень. Експериментальну роботу проводили на базі проблемної лабораторії фітовірусології та біотехнології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Під час виконання роботи здійснювали експерименти, в яких використовували рослини-донори *P. tremula*, стійкі до збудника серцевинної гнилі, з підвищеною продуктивністю та енергією росту, не уражені хворобами та шкідниками, віком 30–40 років, та рослини, отримані *in vitro*.

Первинними експлантами на різних етапах експериментальних робіт слугували частини пагонів (4–6 см) із верхівковими та бічними бруньками. Залежно від типу та походження первинних експлантів підбирали умови стерилізації. Стерилізацію розпочинали із занурення вихідного матеріалу у 70-відсотковий розчин етанолу (30–40 с). Після

цього використовували різні стерилізуючі речовини: 0,5-5-відсотковий розчин натрію гіпохлориту (NaClO 10-30 хв), 16,5-50-відсотковий розчин перексиду гідрогену (H_2O_2 10-15 хв), 0,8-1,0-відсотковий розчин срібла нітрату (AgNO_3 5-10 хв). Всі роботи з культури ізолюваних тканин та органів проводили, спираючись на загальноприйняті методи [3, 4, 7, 8, 9].

Процес індукції та проліферації калюсу здійснювали в термостаті (ТС-80) без освітлення ($t = 24 \pm 2^\circ \text{C}$), культивування тканин і органів на різних етапах морфогенезу – в культуральній кімнаті за температури $24 \pm 2^\circ \text{C}$, відносної вологості повітря (ВВП) – 75 %, із 16-годинним фотоперіодом за умов освітлення 2–3 тис. лк [3].

У процесі роботи, відповідно до кожного етапу, при вивченні морфогенетичних реакцій тканин і органів експлантів *P. tremula* використовували живильні середовища (ЖС) за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [8], Woody plant medium (WPM) [9] та Драйвера (DKW) [7], які було модифіковано. Для підвищення морфогенетичного потенціалу експлантів та регулювання процесів морфогенезу до складу живильних середовищ вносили у різних співвідношеннях та концентраціях фітогормони цитокінінового 6-бензиламінопурин (БАП) ($0,2\text{--}2,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$), тидіазурон (ТДЗ) ($0,1\text{--}2,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$), кінетин ($0,25\text{--}0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) та ауксинового 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) ($0,5\text{--}2,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$), α -нафтилоцтова кислота (НОК) ($0,1\text{--}1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$), β -індолілмасляна кислота (ІМК) ($0,5\text{--}1,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) типу дії. Також до живильних середовищ додавали $7 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ агару, $0,1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ мезоінозиту, джерелом енергії слугувала сахароза $15\text{--}30 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$, величина рН середовища – 5,5–5,6.

Результати досліджень. За результатами проведених досліджень розроблено методику мікроклонального розмноження, що дала можливість отримати генетично-стабільні, вивільнені від хвороб рослини-регенеранти осики з оптимально сформованою кореневою системою та вегетативною масою, придатні до адаптації *ex vitro*.

Запропоновано спосіб отримання асептичних культур з експлантів, ізолюваних із рослин-донорів на стадії активної вегетації (25 % H_2O_2 , експозиція 10 хв і одноразове відмиванням 5 хв), та експлантів, ізолюваних у період опадання листків (1 % AgNO_3 7 хв з одноразовим відмиванням у стерильній воді 1 хв після занурення у 25 % H_2O_2 на 10 хв і одноразове відмиванням 5 хв), що дає змогу одержувати $98,0 \pm 0,5$ % експлантів *P. tremula*.

У процесі досліджень помічено, що бруньки з фрагментами стебел відзначалися вищою регенераційною здатністю порівняно з ізолюваними бруньками й апікальними меристемами. Оптимальним періодом для введення експлантів досліджуваних рослин у культуру *in vitro* є березнь – травень.

Результати експериментів з вивчення регенераційної здатності *in vitro* експлантів досліджуваних рослин довели доцільність використання як базового живильного середовища МС і з додаванням $1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ активованого вугілля та $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП. Активацію наявних у рослині меристем експланта, розвиток мікропагонів і формування кореневої

системи *P. tremula* здійснювали з використанням $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ТДЗ із додаванням $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ активованого вугілля. Отримання значної кількості мікропагонів рослин *P. tremula* шляхом прямого морфогенезу досягали на живильному середовищі з внесенням *P. tremula* $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ТДЗ (змішаний тип морфогенезу – прямий і непрямий із листових, стеблових і корневих експлантів) $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину – прямий морфогенез (рис. 1).



Рис. 1. Формування мікропагонів *P. tremula* на різних типах експлантів (1 – кореневі експланти; 2 – листові експланти; 3, 4 – стеблові експланти)

Використання б/г живильного середовища $\frac{1}{2}$ МС із додаванням сахарози $15 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ МС, або з додаванням $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину для *P. tremula* дало змогу одержати значний коефіцієнт розмноження рослин-регенерантів 15,5 за 28–30-добовий цикл культивування.

За візуального аналізу калюсних культур протягом пасажів спостерігали відмінності в морфологічному розвитку залежно від перебування цих культур на світлі чи у темряві.

Для мікроклонального розмноження рослин *P. tremula* шляхом непрямого морфогенезу вивчено процеси індукції, інтенсивність формування й регенераційну здатність калюсу на експлантатах різних типів (листові пластинки, мікропагони) за умов використання різних регуляторів росту та тривалості культивування. На середовищі з додаванням 2,4-Д $1,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ й ТДЗ $1,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ та $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ – *P. tremula* одержано морфогенні й неморфогенні калюсні тканини з частотою калюсоутворення $93,3 \pm 0,2$ та $98,9 \pm 0,5$ %.

За візуального аналізу калюсних культур протягом пасажів спостерігали відмінності в морфологічному розвитку залежно від перебування цих культур на світлі чи у темряві.

За результатами спостережень встановлено, що *P. tremula* здатна утворювати калюсні культури на різних ЖС в умовах *in vitro* та індукувати утворення мікропагонів (рис. 2).

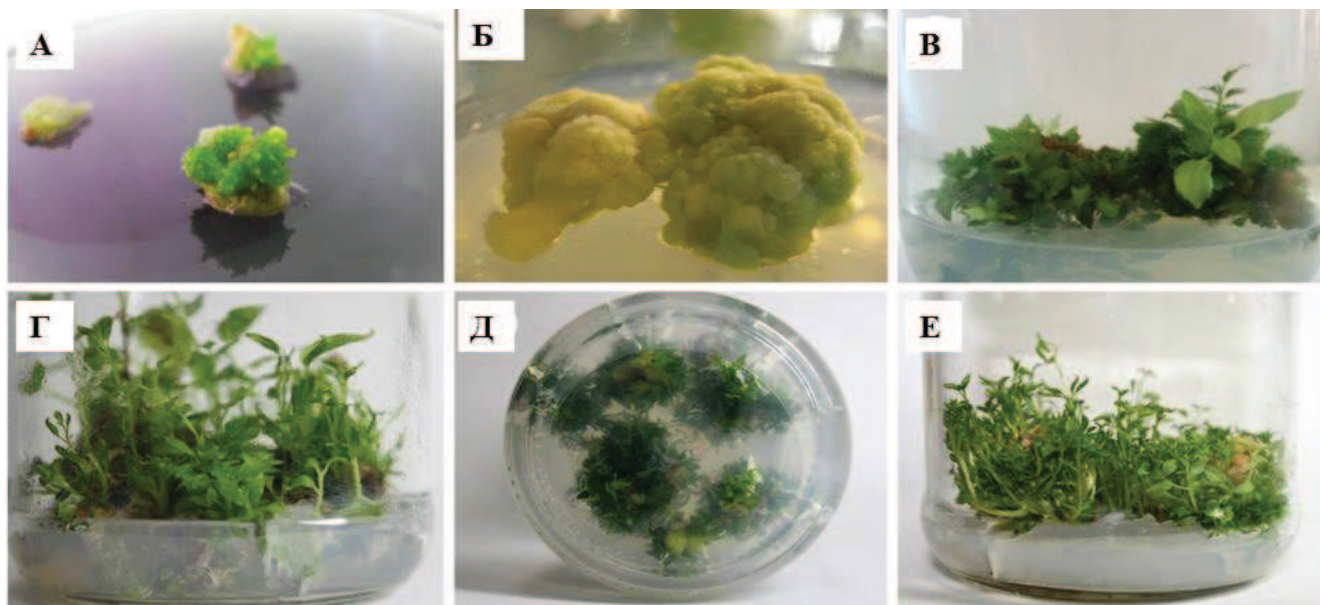


Рис. 2. Непрямий органогенез рослин-регенерантів *P. tremula in vitro*: А – активація синтезу хлорофілу в морфогенних зонах у калюсних культурах *P. tremula*; Б – морфогенний калюс, отриманий із листових експлантів; В – регенерація мікропагонів на калюсних тканинах *P. tremula* (2-й пасаж); Г, Д, Е – утворення мікропагонів *P. tremula* шляхом непрямого морфогенезу (3-й пасаж)

Найефективнішим середовищем для прояву непрямого органогенезу є ЖС: 1) МС із $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ТДЗ і $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ активованого вугілля; 2) МС з $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ТДЗ; МС з $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину.

Підібрані умови культивування калюсних культур забезпечували регенерацію мікропагонів протягом 10 пасажів.

Завершальний, найтрудомісткіший та відповідальний етап, який визначає ефективність технології мікроклонального розмноження, від якого залежить подальший розвиток рослин-регенерантів *in vitro*, – це ризогенез [4, 5].

Перші прояви ризогенезу відзначено на 3-му пасажі ще на етапі живцювання ЖС із $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ТДЗ та $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину. Частота ризогенезу була 25 %. Коренева система мала один потовщений головний корінь довжиною $5,4 \pm 0,5$ см та велику кількість корневих волосків. На нашу думку, відносно раннє укорінення свідчить про високий морфогенний потенціал клітин експлантів *P. tremula*.

У процесі укорінення в умовах *in vitro* найкращим на перших пасажах виявилось ЖС МС із додаванням $0,3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ІМК + $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НОК; МС $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ТДЗ + $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ активованого вугілля, починаючи з 5-го пасажу доцільно використовувати базове МС із повним та зменшеним удвічі складом макросолей із додаванням $15 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ сахарози.

Після накопичення достатньої кількості вегетативної маси, наступним етапом було укорінення рослин-регенерантів *P. tremula*. Для цього відбирали добре сформовані рослини, розмір яких був не менше 3 см, які мали у середньому 2–3 міжвузля та 3–5 листків.

Приживлюваність в умовах *ex vitro* залежала від стійкості рослин проти пониженої вологості, розміру культур *P. tremula*, способу перенесення, терміну висадки, довжини коренів та складу субстрату.

Виявилось, що оптимальними у разі перенесення в умови *ex vitro* були рослини-регенеранти *P. tremula* довжиною не більше ніж $5,5 \pm 0,3$ см. Також встановлено, що найефективнішою – $94,0 \pm 0,4$ % приживлюваності – виявилась адаптація з дорощуванням рослин-регенерантів в умовах теплиці на кокосовому субстраті з перлітом у співвідношенні 1:1.

За умов дорощування в теплиці рослини-регенеранти характеризувались швидкою адаптацією до умов живлення та існування. Невелика втрата тургору була помітна лише в перший день адаптації. Всі адаптовані рослини мали високі приживлюваність та ріст.

Висновки

Для практичного використання в лісовирощуванні та декоративному садівництві на основі біотехнологічних методів розроблено технологію отримання великої кількості однорідного, оздоровленого садивного матеріалу *P. tremula*, стійкої до збудника серцевинної гнилі та адаптації його до умов *ex vitro*. Встановлено, що для отримання асептичної культури *P. tremula* доцільно використовувати ступінчасту стерилізацію – 1-відсотковий AgNO_3 (7 хв), відмивання у стерильній воді 1 хв, 25-відсотковий H_2O_2 (10 хв), відмивання у стерильній воді (5 хв). Для масового мікроклонального розмноження *in vitro* слід застосовувати модифіковані живильні середовища: 1) МС з $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину + $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ активованого вугілля; 2) МС з $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ТДЗ + $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ активованого вугілля.

Укорінення мікропагонів активно проходить на модифікованих середовищах: 1) МС + $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ТДЗ + $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ активованого вугілля; 2) б/г МС + $15 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ сахарози; 3) $\frac{1}{2}$ МС б/г.

Також встановлено, що адаптацію рослин-регенерантів *P. tremula* необхідно проводити в умовах теплиці протягом 30 діб на суміші, яка складається з кокосового субстрату : перліту у співвідношенні 1:1, після чого пересаджувати садивний матеріал на плантації.

Список літератури

1. Булычёва Н. В. Изучение влияния сочетаний фитогормонов на каллусообразование и регенеративную способность тополя *Populus populus* spp. / Н. В. Булычёва, А. М. Камионская, К. Г. Скрыбин // Межд. моск. трет. конгр. [«Биотехнология: состояние и перспективы развития»], 14–18 марта, 2005 г. : тез. докл. – М., 2005. – Ч. 1. – С. 234.
2. Прямий органогенез *in vitro* тирличу жовтого (*Gentiana Lutea* L.) / [І. І. Конвалюк, Н. Б. Кравець, Н. М. Дробик та ін.] // Біотехнологія. – К. :

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, 2010. – Т. 3, № 5. – С. 66–73.

3. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. – К. : Наукова думка, 2005. – 270 с.

4. Ковалевський С. Б. Культура *Populus tremula* L. : [монографія] / С. Б. Ковалевський, С. Ю. Білоус, А. Ф. Ліханов. – К. : НУБіП України, 2014. – 189 с.

5. Ahuja M. R. Aspen. In: Evans DA, Sharp WR and Ammirato PJ (Eds.) Handbook of Plant Cell Culture / M.R. Ahuja ; Macmillan Publishing Company. – New York, 1986. – Pp. 626–651.

6. Aubakirova L. Application of cellular biotechnology for storage of aspen biodiversity (*Populus tremula* L.) / L. Aubakirova, E. Kalashnikova // International journal of agriculture: Research and review. – 2011. – Vol. 1 (1). – P. 16–20.

7. Driver J. A. In vitro propagation of Paradox walnut root stock / J. A. Driver, A. H. Kuniyuki // HortScience. – 1984. – 19. – P. 507–509.

8. Murashige T. A revised medium for rapid, growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. A. Scoog // Physiol. plantarum. – 1962. – Vol. 15. – № 3. – P. 473–497.

9. McCown B. H. Woody plant medium (WP 14) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species / B. H. McCown, G. B. Lloyd // Physiol. plantarum. – 1981. – Vol. 16. – P. 453.

10. Pijut P. M. Micropropagation of *Juglans cinerea* L. (Butternut) / P. M. Pijut // Biotechnology in agriculture and forestry. – Berlin : Springer-Verlag, 1997. – V. 39. – P. 345–357.

11. 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. – 2007. – № 13. – P. 623–626.

Установлены особенности микроклонального размножения *P. tremula*. Исследованы способы получения асептической культуры, индукции прямой регенерации тканей *P. tremula* в зависимости от генотипа, типа экспланта и условий культивирования *in vitro*. Определены пути реализации морфогенетического потенциала микропобегов *P. tremula*. Установлены оптимальные составляющие питательной среды с добавлением 0,25-0,5 мг·л⁻¹ кинетина, тидиазурона и активированного угля, которые обеспечили полную реализацию морфогенетического потенциала эксплантов с образованием укоренившихся растений, возможностью долгосрочного культивирования *P. tremula* в условиях *in vitro* и адаптации растений к условиям *ex vitro*.

Ключевые слова: *Populus tremula* L., микроклональное размножение, питательная среда, эксплант, морфогенез, регуляторы роста, плантационное выращивание.

The peculiarities of microclonal propagation of *P. tremula* were determined. Way of getting aseptic culture, direct inducing of tissue regeneration of *P. tremula*, which depending on genotype, type of explants and culture conditions in vitro were researched. Ways of morphogenetic potential realization of micro shoots *P. tremula* were studied. The optimal components of the culture medium with the addition of 0.25-0.5 mg·l⁻¹ KIN, TDZ and activated carbon were set. The nutrition mediums provided the full realization of morphogenetic potential, to form explants rooted plants of *P. tremula* in conditions in vitro and adaptation plants to ex vitro conditions.

Key words: *Populus tremula* L., micropropagation, nutrient media, explant, morphogenesis, growth regulators, cultivation plantation.

УДК 712.414: 634.381

МОДИФИЦИРОВАННАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ЖИВЫХ ИЗГОРОДЕЙ НА ПРИМЕРЕ *MORUS ALBA* L. И ЕЕ ДЕКОРАТИВНЫХ ФОРМ

**В. А. Витенко, кандидат биологических наук, доцент
Уманский национальный университет садоводства
e-mail: vitenko.vova@yandex.ru**

На основании изучения литературных данных о живых изгородях рассмотрена их классификация с учетом высоты, формы, сложности устройства (одно-, дву-, трехрядные), видового разнообразия (одно-, дву-, многовидовые), биологических особенностей (вечнозеленые, листопадные, мелколистные, крупнолистные и т. д.). Предложено модифицировать классификацию данных живых изгородей путем дополнительного раздела их по способу посадки (рядовой, шахматный), а также наличию и отсутствию штамба – штамбовые и бесштамбовые (низкие, средние и высокие). На примере *Morus alba* L. и ее декоративных форм: М. а. 'Pendula', М. а. 'Globosa', М. а. 'Pyramidalis', и М. а. 'Contorta' описаны новые подходы к использованию и формированию живых изгородей, учитывая особенности озеленения различных территорий.

Ключевые слова: модификационная классификация, живые изгороди М. а. 'Pendula', М. а. 'Globosa', М. а. 'Pyramidalis', и М. а. 'Contorta'.

Живые изгороди выполняют несколько функций: защитную (оберегая хозяев данной территории от непрошенных гостей, излишних глаз, пыли и шума); эстетическую (вместе с другими растениями создают обстановку гармонии человека и природы, придавая этому участку неподражаемую