УДК 581.1: 577.2

УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЕЖЕННЯ МІСКАНТУСА

В.В. МАЦКЕВИЧ, Л.М. ФІЛІПОВА, кандидати сільськогосподарських наук
Білоцерківський НАУ

Наведено результати досліджень з вдосконалення технології клонального мікророзмноеження Miscanthus giganteus.

Види роду *Miscanthus,* особливо швидкоростучий гібрид *Miscanthus giganteus,* завдяки своїй здатності швидко розростатися за мінімальних затрат і невеликого виносу поживних речовин (рослина типу C_4), мають великі перспективи для використання в якості високосортної сировини для целюлозних підприємств, автомобільної промисловості для виробництва біоетанолу або біогазу. Ця культура внаслідок формування великої біомаси у розрахунку на одиницю площі угідь може бути альтернативою деревному або рідкому паливу [1]. У садово-парковому будівництві міскантус також використовується для висаджування одиночними саджанцями або як жива загорожа. Поряд з великими перспективами використання впровадження цієї культури гальмується тим, що велика кількість генотипів міскантусу не квітне або не утворює насіння, тому розмноження переважно здійснюється вегетативним шляхом — поділом кореневищ. Для отримання у великих кількостях посадкового матеріалу перспективним є клональне мікророзмноження з дорощуванням пробіркового матеріалу в теплиці. Оскільки в Україні технологія клонального мікророзмноження цього виду мало вивчена, **метою** наших досліджень був аналіз технологічних прийомів *in vitro* та подальшого удосконалення.

Методика досліджень. Дослідження проводилися на базі міжкафедральної лабораторії Білоцерківського національного аграрного університету "Біотехнологія рослин". Регенеранти культивували *in vitro* на штучному живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга з додаванням 30 г/л сахарози. Обсяг вибірки для статистичної обробки становив 30 рослин.

Результати досліджень. Оскільки світло є фактором, що детермінує перебіг онтогенетичних процесів у регенерантах, нами порівнювалися особливості регенерації експлантів за освітлення від 24 до 8 годин на добу. Встановлено, що довший фотоперіод збільшує розміри регенерантів, але на істотну величину зменшує кількість пагонів: з 3,3 шт. за освітлення 8 годин на добу до 1,4 шт. за цілодобового освітлення (табл. 1). Зменшення фотоперіоду з

24 до 8 годин на добу обумовлює істотне зменшення довжини кореневої системи регенерантів з 18,0 до 3,3 мм.

1. Вплив довжини освітлювального періоду на регенерацію експлантів міскантусу на 50-ту добу культивування

Освітлювальний період, годин на добу	Висота рослин, мм	Кількість пагонів, шт.	Довжина кореневої системи, мм	Приживаність рослин, %
24	75,0	1,4	18,0	97,0
16	63,0	1,6	13,5	96,0
12	54,5	2,5	4,8	91,0
8	46,5	3,3	3,3	88,7
$НІР_{05}$	*3,6*	*0,2*	*1,1*	*3,8*

Висока вартість агар-агару, що є найбільш поширеним гелеутворювачем, зумовлює потребу постійного пошуку його замінників. Нами випробувано геланову камедь, яка є дешевшою і додається у середовище у менших кількостях (4,5–5,0 г/л при 7,0–7,5 г/л агар-агару). Регенеранти вирощені на такому замінику, мало відрізнялися від вирощених на агар-агарі (табл. 2). Спостерігалося лише в межах похибки досліду збільшення кількості пагонів та зменшення кількості коренів. На нашу думку, геланову камедь за нижчої ціни доцільно застосовувати для загущення середовища з метою зменшення собівартості виробництва.

2. Регенерація експлантів міскантусу залежно від гелеутворювачів у живильному середовищі (50-ту добу культивування)

гелеутворювач	Висота рослин, мм	Кількість пагонів, шт.	Кількість коренів, шт.	Довжина кореневої системи, мм	Приживаність регенерантів, %
Агар-агар	55	1,40	3,58	59,0	94,5
Геланова камедь	57	1,63	3,03	56,5	95,3
$НІР_{05}$	*4*	*0,46*	*0,32*	*2,9*	*4,2*

Для швидкого розмноження міскантусу *in vitro* застосовують зняття апікального домінування шляхом видалення верхівкової бруньки. Якщо така брунька у більшості дводольних ідентифікується візуально і легко видаляється, то у злаків, зокрема у міскантуса, її складно візуально визначити, тому застосовується обрізка пагона, що індукує утворення бічних пагонів (рис. 1).

Рис. 1. Поділ рослини міскантусу на стеблові експланти:
1 — ціла вихідна рослина; **2** — обрізані експланти з видаленими відмерлими листками.

Нами порівнювалися приживлюваність та біометричні характеристики регенерантів за різної довжини стеблового експланта — від 10 до 50 мм ізольованого з вихідної рослини — куща *in vitro* (табл. 3). При цьому було встановлено, що збільшення обрізки стимулює утворення більшої кількості бічних пагонів, а отже, збільшення коефіцієнта розмноження. Так, якщо без обрізки (контроль) кількість пагонів становила 1,68 шт. на регенерант, то у варіанті з висотою пагона 10 мм — 3,68 шт. Однак короткі пагони експлантів обумовлювали низьку приживлюваність регенерантів — 56% порівняно з 96% на контролі. Тому, на нашу думку, більш доцільним є обрізка пагона на висоті 20 мм. Це забезпечувало утворення 3,40 шт. бічних пагонів на регенерант та 83% приживлюваності.

3. Вплив обрізування пагонів на регенерацію живців міскантусу

Залишено пагону після обрізування, мм	Висота рослини, мм	Кількість пагонів, шт.	Кількість коренів, шт.	Приживаність регенерантів, %
Без обрізування (контроль)	71,75	1,68	6,0	96,0
50	67,25	1,93	5,5	93,5
40	64	2,58	1,9	89,5
30	59,75	3,00	1,1	86,5
20	50,25	3,40	0,2	83,0
10	46,50	3,68	0,1	56,0
$НІР_{05}$	*2,3*	*0,3*	*0,2*	*4,4*

За попередніми спостереженнями встановлено, що часто навколо регенерантів утворюються темні плями на поживному середовищі, які за даними літератури обумовлюються утворенням фенольних сполук, що пригнічують розвиток рослин [2]. Для усунення цього явища випробувано ефективність видалення відмерлих листків з пагонів-експлантів (табл. 4). Це зокрема, істотно збільшувало кількість пагонів у регенерованих рослин з 1,40 до 2,18 шт. Також кількість регенерантів, навколо яких утворювалися фенольні плями, зменшилася на істотну величину з 4,75% до 1,25%.

4. Вплив видалення відмерлих листків на регенерацію живців міскантусу

Видалення відмерлих листків	Висота рослин, мм	Кількість, шт.		Довжина кореневої системи, мм	Рослин, %	
		пагонів,	коренів		з фенольними виділеннями	прижилось
Без видалення (контроль)	54,50	1,40	5,57	59,00	4,75	94,50
З видаленням	62,25	2,18	4,08	62,75	1,25	97,53
$НІР_{05}$	*2,1*	*0,07*	*0,11*	*3,3*	*0,9*	*3,6*

Одними з найбільш дієвих детермінантів онтогенезу *in vitro*, що дозволяє скерувати регенерацію рослинних експлантів згідно технологічних потреб, є фітогормони. Залежно від того, чи потрібно збільшити коефіцієнт розмноження, або ж стимулювати ризогенез, змінюють концентрації в основному двох класів фітогормонів або речовин з подібною активністю: цитокінінів та ауксинів. За випробування різних концентрацій у живильному середовищі синтетичного цитокініну бензиламінопурину (БАП) встановлено, що для отримання більшого коефіцієнта розмноження оптимальними є концентрації 2 і 3 мг/л (табл. 5).

5. Вплив речовин з цитокініновою активністю на регенерацію експлантів міскантусу

Вміст у середовищі, мг/л	Кількість пагонів, шт.	Кількість коренів, шт.	Частка регенерантів з фенольними виділеннями, %	Приживаність регенерантів, %
0 (контроль)	1,42	3,58	4,51	94,5
1	2,07	2,12	7,75	95,0
2	3,45	0,95	17,0	89,3
3	4,08	0,25	31,11	77,3
5	1,53	0,08	74,01	62,5
10	1,18	–	97,25	84,5
$НІР_{05}$	*0,33*	–	*3,26*	*4,7*

При додаванні 2 мг/л БАП кількість пагонів на регенеранті у середньому становила 3,45 шт. за 89,3% приживаності. Збільшення концентрації БАП до 3 мг/л збільшувало кількість пагонів до 4,08 шт. на регенерант, але істотно зменшувало приживаність регенерантів — до 77,31%. Тому, на нашу думку, використовувати БАП у таких концентраціях необхідно з обережністю, або додавати речовини, які зменшують фітотоксичність цього гормону. Перспективним також є застосування аденіну, який є вихідною речовиною для синтезу цитокінінів у рослинній клітині [3]. Зокрема, нами успішно використовується аденін при вирощуванні *Thuja occidentalis* [4] та *Solanum tuberosum* [5].

З практики мікроклонального розмноження відомо, що наскільки не був би високим коефіцієнт розмноження в культурі *in vitro*, затрати будуть окуплені лише в тому випадку, коли регенеранти успішно пройдуть постасептичну адаптацію. Одним з головних показників успішної адаптації є інтенсивний ризогенез регенерантів перед виходом з асептичних умов. За результатами попередніх досліджень встановлено, що збільшення фотоперіоду покращує ризогенез. Після підбору оптимальних концентрацій нами проведено порівняння в якості індукторів ризогенезу синтетичних речовин з ауксиновою активністю: індолілоцтової кислоти (ІОК), індолілбутурилової кислоти (ІБК) та експериментального препарату, синтезованого в Інституті біоорганічної хімії і нафтохімії НАНУ, Д-18, який успішно зарекомендував при асептичному культивуванні картоплі [6] (табл. 6).

6. Вплив речовин з ауксиновою активністю на регенерацію експлантів міскантусу

Вміст у середовищі, мг/л	Кількість пагонів, шт.	Кількість коренів, шт.	Довжина кореневої системи, мм	Приживаність регенерантів, %
Контроль (без гормонів)	1,40	3,58	59,0	82,6
ІОК 2 мг/л	1,48	6,98	83,3	91,8
ІБК 1 мг/л	1,63	3,15	64,5	91,8
Д-18 0,1 мг/л	1,35	6,53	9,3	87,8
$НІР_{05}$	*0,31*	*0,61*	*4,8*	*3,9*

Встановлено, що за кількістю пагонів регенеранти відрізнялися лише в межах помилки досліду. За цим показником кращі результати були одержані при застосуванні ІБК у кількості 1 мг/л. За показниками ризогенезу та приживаності статистично кращим був варіант з додаванням у середовище 2 мг/л ІОК (рис. 2).

1 — новоутворені пагони;
2 — ризома;
3 — коренева система;
4 — відмираючі листки.

Рис. 2. Розвиток міскантусу *in vitro* на 60-ту добу культивування за додавання 2 мг/л ІОК:

Висновки. За результатами наших досліджень пропонуються такі удосконалення технології клонального розмноження *Miscanthus giganteus:*

1) для збільшення кількості пагонів доцільним є короткий фотоперіод (8–12 годин на добу), а для отримання рослин з розвиненою кореневою системою — довгий фотоперіод 16–24 годин на добу;
2) як замінник агар-агару можна застосовувати геланову камедь;
3) обрізка пагонів-експлантів індукує утворення більшої кількості бічних пагонів у регенерантів;
4) видалення відмерлих листків при живцюванні покращує регенерацію експлантів;
5) для збільшення кількості пагонів у середовище доцільно додавати БАП в кількості 2–3 мг/л;
6) додавання 2 мг/л ІОК є ефективним індуктором ризогенезу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Зінченко В.О. Біогеліоенергія — наше енергетичне майбутнє//Пропозиція. — 2006. — №.8 — С. 130–132.
2. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. — Киев: Наукова думка, 1992. — 232 с.
3. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
4. Мацкевич В.В., Власенко М.Ю., Філіпова Л.М. Ефективність тривалого клонального мікророзмноження *Thuja occidentalis 'Smaragd'* залежно від компонентів живильного середовища та стану експлантів / Зб. наук. пр. Уманського НУС. — Умань, 2010. — Вип. 74. — Ч. 1: Агрономія. — С. 324–329.
5. Власенко М.Ю. Мацкевич В.В, Дульнєв П.Г., Козак Л.А. Детермінація онтогенезу рослин картоплі в умовах in vitro синтетичними фітогормонами класу цитокінів// Матеріали тез міжнародної науково-практичної конференції «інноваційні агротехнології в умовах глобального потепління». — Мелівтополь-Кирилівка, 4–6 червня 2009 р. — С. 24–25.
6. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Власенко М.Ю., Дульнєв П.Г. Застосування нових синтетичних фітогормонів для детермінації онтогенезу рослин картоплі в умовах *in vitro* / Зб. наук. пр. Уманського НУС. — Умань, 2011. — Вип. 75. — Ч. 1: Агрономія. — С. 115–121.

Одержано 4.06.12

По результатам исследований предлагается для увеличения количества побегов Miscanthus giganteus краткий фотопериод (8–12 часов в сутки), а для получения растений с развитой корневой системой — длинный (16–24 часов в сутки); как заменитель агар-агара применять гелановую камедь; обрезка побегов-эксплантов индуктирует образование большего количества боковых побегов у регенерантов; удаление отмерших листьев при черенковании улучшает регенерацию эксплантов; для увеличения количества побегов в среду целесообразно добавлять БАП в количестве 2–3 мг/л; добавление 2 мг/л ИОК является эффективным индуктором ризогенеза.

Ключевые слова: *Miscanthus giganteus, регенерация, ризогенез, гормоны, фотопериод.*

According to the research results it was suggested to use short photoperiod (8–12 hours in twenty-four hours) for the increase of quantity of sprouts of Miscanthus giganteus, and to use long period (16-24 hours in 24 hours) in order to

get plants with the developed root system. Gellan gum can be applied instead of agar-agar. Cutting of explant sprouts induces formation of greater amount of laterals in regenerants. Removing of dead leaves during cutting improves the regeneration of explants. For the increase of amount of sprouts it is reasonable to apply benzylaminopurine in the amount 2–3mg/l. Adding of 2 mg/l of indoleacetic acid is an effective inductor of rhizogenes.

***Key words**: Miscanthus giganteus, regeneration, rhizogenes, hormones, photoperiod.*

УДК 582.734.3: 581.6: 575.86: 631.527: 634.10

МОБІЛІЗАЦІЯ ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ РОДУ *PYRUS* L. ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В СЕЛЕКЦІЇ ГРУШІ

А.І. ОПАЛКО, кандидат сільськогосподарських наук
Н.М. КУЧЕР, аспірант
О.А. ОПАЛКО, кандидат сільськогосподарських наук
Національний дендрологічний парк „Софіївка" НАН України
А.Д. ЧЕРНЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук
Уманський національний університет садівництва

Узагальнено результати вивчення видового і сортового складу колекції роду Pyrus L. НДП «Софіївка» НАН України з матеріалами досліджень виконаних ученими різних країн світу щодо походження груші. Обговорено значення уточненої схеми міжвидових зв'язків у роді Pyrus для мобілізації генетичних ресурсів, які можуть бути використані в селекції груші.

Рід *Pyrus* L. (груша) належить до родини *Rosaceae* Juss., підродини *Spiraeoideae* C. Agardh, надтриби *Pyrodae* Camp., Ev., Morg. et Dick., триби *Pyreae* Baill., підтриби *Pyrinae* Dumort. [22, 28]. Впродовж тривалого часу ми [7, 9, 12], як і багато інших авторів [6, 13, 16, 18–20], зараховували рід *Pyrus* до складу підродини *Maloideae* C. Weber або *Pomoideae* Focke, родини *Rosaceae*. Правомірність розташування видів груші у підтрибі *Pyrinae*, однак у підродині *Maloideae* (*Pomoideae*), визнають і деякі сучасні автори [21].

Натомість у перевиданій в 2009 році книзі "Flowering Plants" А.Л. Тахтаджян [29] запропонував свою версію системи квіткових рослин, перероблену з урахуванням останніх результатів молекулярної філогенетики, в якій роди *Crataegus*, *Cydonia*, *Malus*, *Pyrus* та інші преставники яблуневих об'єднані у підродину *Pyroideae* (колишню *Maloideae*). За цією версією