

УДК 581.1: 635.9

**УТВОРЕННЯ РЕГЕНЕРАНТАМИ ФЕНОЛПОДІБНИХ РЕЧОВИН
ПІД ЧАС ПЕРШИХ СУБКУЛЬТИВУВАНЬ
ЗАЛЕЖНО ВІД УМОВ ТА ВИДУ РОСЛИНИ**

*Л. Філіпова, к. с.-г. н., В. Мацкевич, к. с.-г. н.
Білоцерківський національний аграрний університет*

Постановка проблеми. Під час культивування мікроживцюванням *in vitro* багатьох рослин, особливо деревних і чагарникових порід, часто внаслідок механічного пошкодження при ізолюванні експлантів спостерігається виділення фенольних сполук у живильне середовище у вигляді темно-коричневих плям. Відомо, що синтез цих сполук антагоністично впливає на клітинну проліферацію, зменшує ефективність засвоєння регенерантами азоту [1] та ризогенез [2]. Фенольні сполуки також виділяються рослиною у відповідь на стресову ситуацію, наприклад, внаслідок травмування або дії фітовірусної інфекції [3]. Водночас спостерігається вихід фенолів із вакуолей у плазму та їх окиснення локалізованими там ферментами з утворенням інгібуючих ріст продуктів [4]. Вплив фенолів та інших чинників зумовлює зменшення регенераційного потенціалу за тривалого субкультивування [1; 2; 5].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Вирішити проблеми самоотруєння фенолами пропонують додаванням різних речовин у живильне середовище, наприклад збільшенням концентрації гліцину за вирощування *in vitro* рідкісних видів орхідних флори Криму [8]. Автор встановив, що період активного росту проростків орхідних супроводжувався виділенням у живильне середовище значної кількості фенольних сполук, які уповільнювали зростання проростків. Причому їх виділення спостерігали лише у видів, схильних до утворення фенолів і у разі культивування експлантів дорослих нативних рослин. Це види, зростаючі на відкритих просторах – на узліссі та світлих схилах, такі як *Ophrys oestriifera*, *Anacamptis pyramidalis*, *Himantoclossum caprinum*. Певно, таку здатність ці види орхідних утворили в ході еволюційних пристосувань та алелопатичних взаємодій рослин у фітоценозі.

Склад живильного середовища, що застосовується для регенерації рослин *Cymbidium Sw.* у відділі біотехнології Нікітського ботанічного саду, був модифікований для видів, які інтенсивно виділяють у живильне середовище феноли. При цьому застосовували підвищені концентрації гліцину (50,6–63,2 мкМ) як у разі культивування проростків, так і органів природних рослин. Найкраще коренеутворення відзначене за використання ІМК і НОК у концентрації 2,46 мкМ та 2,69 мкМ відповідно [8].

Щоб уникнути виділення фенолів, до живильного середовища також рекомендують додавати активоване вугілля (1–2 г/л), адсорбційні властивості якого сприяють рівномірному розподілу елементів живлення у середовищі та видаленню продуктів метаболізму [5].

Поширеним у практиці є часте пересаджування експлантів [5]. Наприклад, для малини пропонують проводити за перших субкультивувань пересаджування експлантів щотижня [9]. Тобто у кожному окремому випадку застосовують різні шляхи усунення цього процесу.

Постановка завдання. Метою нашого дослідження було вдосконалення методики первинного субкультивування експлантів *Thuja occidentalis 'Smaragd'* *Miscanthus giganteus*, *Sclerocactus spinosior*.

Рослини культивували за асептичних умов у біологічних пробірках зі штучним живильним середовищем за Мурасіге і Скугом. Повторність дослідів чотириразова – по 30 експлантів у варіанті.

Виклад основного матеріалу. Під час оптимізації процесу тривалого клонального мікророзмноження *Thuja occidentalis 'Smaragd'* встановлено вплив на фенолоутворення частини компонентів живильного середовища й стану експлантів. Для дослідження фенолоутворення та морфогенезу випробували різні за походженням види експлантів, ізольованих з нативних умов: верхівкові меристеми пагона (0,2–0,3 мм), живці, отримані з однорічного приросту пагона, насіння, пагін проростка з двома хвоїнками, отримані з насіння на перлітному субстраті (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив виду експланта на регенерацію та виділення фенолоподібних речовин регенерантами *Thuja occidentalis 'Smaragd'* за введення в асептичні умови

Тип експланта	Експланти з фенольними виділеннями, %	Регенеранти, що мали, %			Морфогенез відсутній
		корені	пагони	корені і пагони	
Меристема	81,8	8,7	13,1	16,6	57,3
Стебловий живець	95,4	1,4	0,6	0,9	14,8
Насіння	14,9	2,6	11,1	14,6	3,9
Пагін проростка	58,7	29,2	38,7	24,1	0,8
НІР _{0,95}	7,7	0,4	0,3	0,3	0,5

Від виду експланта залежала поява в середовищі фенольних плям. Під час регенерації експлантів стеблових живців порівняно з іншими варіантами такі

виділення встановлено у найменшій кількості у разі застосування насіння, що ще раз підтверджує раневу природу виділення фенольних сполук у середовище [4]. Найбільший відсоток регенерантів зі стеблом і кореневою системою отримано за введення в культуру пагонів проростків.

За Ф.Л. Калініним та співавт. [1], індуктором утворення фенолів *in vitro* під час живцювання (поранення рослин) є переважання цитокинів над ауксинами. Тому ми замінили кінетин у живильному середовищі на аденін, що також має цитокинінову активність, але значно слабшу [6; 7].

Встановлено (табл. 2), що ефект від застосування аденіну в концентрації 1 мг/л не відрізнявся від контролю (без гормонів). Сумісне використання цієї самої кількості аденіну з кінетином зумовлювало появу більшої кількості регенерантів із фенольними плямами. Досить часто такі регенеранти через 10–15 днів після живцювання відмирили. Вважаємо, що причиною цього є фітотоксичність зазначених виділень для рослин (самоотруєння). Вона проявлялася як інтенсивним калусоутворенням, так і вітрифікацією. Регенеранти, які виживали, мали, як правило, майже відсутню кореневу систему та вкорочені пагони. Додавання аденіну в кількості 20 мг/л дало змогу збільшити вихід регенерантів порівняно з контролем із 71,2% до 89,5%. Серед них була більша кількість із розвинутим пагоном і коренем, зменшувалася до 24,9% кількість регенерантів, які виділяли феноли в середовище.

Оскільки відомо, що аскорбінова кислота в рослинному організмі відновлює феноли до нетоксичних сполук [6], то в подальшій модифікації середовища, окрім додавання аденіну (20 мг/л), ми збільшили кількість аскорбінової кислоти з 1 мг/л до 15 мг/л. Це дало змогу збільшити вихід регенерантів з експлантів і ще зменшити до 3,8 % кількість регенерантів із виділеннями в середовище.

Таблиця 2

Вплив аденіну та кінетину на ефективність клонального мікророзмноження
Thuja occidentalis 'Smaragd'

Варіант	Регено- ровано рослин зі 100 живців, %	З них утворили, %			
		корені	пагони	корені і пагони	фенольні виділення
1. Контроль (без гормонів)	71,2	17,7	52,9	25,4	93,1
2. Кінетин 1 мг/л	64,1	11,3	76,4	12,3	97,3
3. Аденін 1 мг/л	73,2	15,8	48,1	36,1	91,7
4. Кінетин 1 мг/л +	57,2	4,3	87,9	7,8	98,4

аденін 1 мг/л					
5. Аденін 20 мг/л	89,5	8,5	14,7	76,8	24,9
6. Аденін 20 мг/л +15 мг/л аскорбінової кислоти*	97,3	1,7	3,2	95,1	3,8
НІР _{0,95}	4,6	2,0	3,2	4,8	5,1

* У всіх варіантах, за винятком 6, аскорбінову кислоту добавляли в кількості 1 мг/л.

Появу фенолоподібних речовин можуть спричинити і відмираючі тканини експлантів. За попередніми спостереженнями встановлено, що часто навколо регенерантів утворюються темні плями на поживному середовищі, які, за літературними даними, зумовлюються утворенням фенолоподібних сполук, що пригнічують розвиток рослин [1]

Для усунення цього явища випробувано ефективність видалення відмерлих листків із пагонів-експлантів (табл. 3, рис. 1). Це, зокрема, істотно збільшувало кількість пагонів у регенованих рослин з 1,40 до 2,18 шт. Також кількість регенерантів, навколо яких утворювалися фенольні плями, достовірно зменшилася з 4,75 % до 1,25%.

Таблиця 3

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	прижилося
Без видалення (контроль)	54,5	1,4	5,6	59,0	4,8	94,5
З видаленням	62,2	2,2	4,1	62,8	1,3	97,5
НІР _{0,95}	2,1	0,07	0,11	3,3	0,9	3,6

На утворення фенолів впливає й розмір раневої поверхні. Наприклад, за клонального мікророзмноження *Sclerocactus spinosior ssp. Blainei "schleseri"* було встановлено, що способи ізоляції експлантів впливають на регенерацію з них рослин та утворення фенольних плям на поживному середовищі.

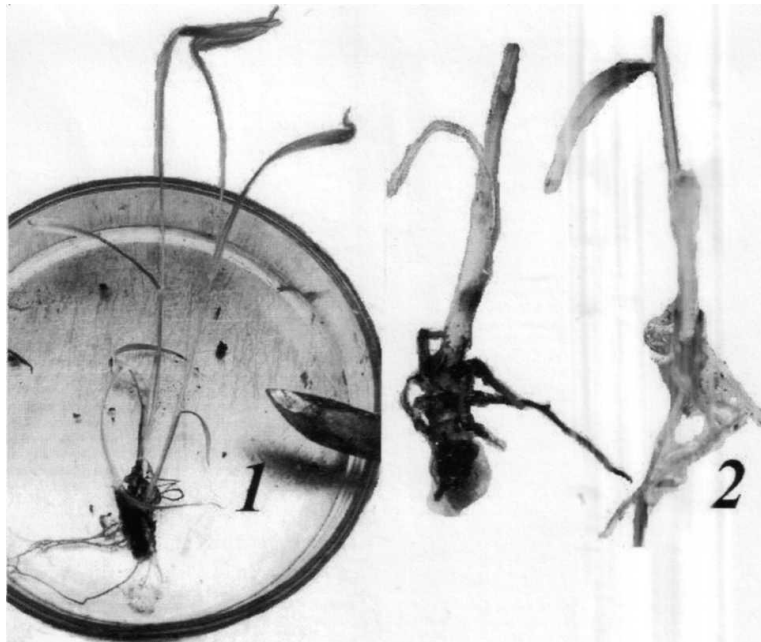
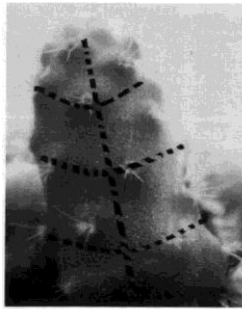


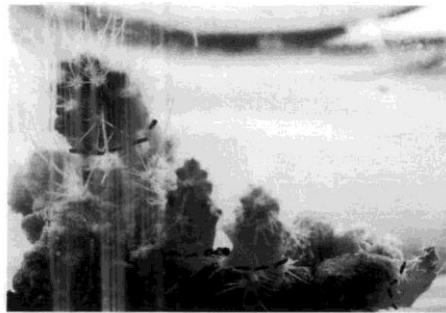
Рис. 1. Поділ рослини міскантусу на стеблові експланти: 1 – ціла вихідна рослина; 2 – обрізані експланти з видаленими відмерлими листками.

У разі поділу стебла на шматки, де ранева ділянка становила половину всієї поверхні, навколо експланта утворювалися великі плями. Близько третини таких експлантів гинуло, в інших було інтенсивне калюсоутворення (рис. 2). В експлантів, що були отримані ізоляцією бруньок, ранева поверхня становила близько 1/10 від усієї поверхні. За 5–6 тижнів із таких експлантів утворювалися нормальні пагоні, які після перенесення на середовище з 1,0 мг/л індолілбутилової кислоти формували кореневу систему й були готові до висаджування у відкритий ґрунт.

Висновки. Отже, для боротьби з фенольними виділеннями в культурі *in vitro* ефективним є: 1) підбір первинних експлантів; 2) видалення старих відмираючих тканин; 3) зміна живильного середовища збільшенням концентрацій аскорбінової кислоти, гліцину, заміни на аденін або зменшенням концентрацій цитокінінів і додаванням активованого вугілля; 4) підбір способів ізоляції експлантів, що передбачали б якнайменшу раневу поверхню.



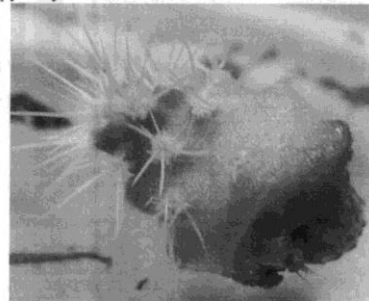
Поділ на частини стебла



Поділ брунькуванням



Регенеранти з калюсом та фенольними виділеннями



Повноцінний регенерант, придатний до укорінення

Рис. 2. Вплив способу ізоляції експлантів на регенерацію рослин із них.

Бібліографічний список

1. Калинин Ф.Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сарнацкая. – К. : Наук. думка, 1992. – 232 с.
2. Пронина И.Н. Оптимизация процесса ризогенеза подвоев яблони и груши *in vitro* : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. с.-х наук : 06.01.07 / И.Н. Пронина. – Мичуринск, 2008. – 20 с.
3. Улинець В.З. Вплив вірусної інфекції на спектральні характеристики фотосинтетичного апарату рослин родини *Solanaceae* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : 03.00.06 / В.З. Улинець. – К, 2002. – 22 с.
4. Полещук С.В. Біологічна активність антиоксидантів в культурі тканин томата *in vitro* : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : 03.00.20 / С.В. Полещук. – Херсон, 1998. – 18 с.
5. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К. : Наук. думка, 2005. – 267 с.
6. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К. : Логос, 2005. – 730 с.
7. Мацкевич В.В. Особливості бульбоутворення з живців рослин *in vitro* сорту Подолянка залежно від компонентів живильного середовища / В.В. Мацкевич, М.Ю. Власенко,

В.В. Хоменко // Картоплярство України. – Немішаєве : ІК УААН, 2009. – Вип. № 3-4 (16-17). – С. 23–27.

8. Попкова Л.Л. Рідкісні види орхідних флори Криму, їх мікророзмноження та підтримання біологічної різноманітності : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : 03.00.05 / Л.Л. Попкова. – Ялта, 1999. – 17 с.

9. Ковальчук И.Ю. Микрклональное размножение малины, как метод сохранения биоразнообразия растений в Казахстане / [И.Ю. Ковальчук, З.Р. Мухитдинова, Т.Т. Турдиев и др.] // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира : Сб. статей по матер. II Всерос. науч.-практ. конф. – Волгоград, 2008. – С. 134–137.

Філіпова Л., Мацкевич В. Утворення регенерантами фенолоподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від умов та виду рослин

На основі результатів досліджень з асептичного вирощування *Thuja occidentalis* 'Smaragd' *Miscanthus giganteus*, *Sclerocactus spinosior* показано можливість уникнення самоотруєння регенерантів фенолоподібними речовинами. Визначено вплив виду рослини, гормонів, аскорбінової кислоти та розміру раневої поверхні на утворення цих речовин. Представлено зміни в прописах живильного середовища для перших культивувань рослин.

Ключові слова: експлант, регенерант, фенолоподібні речовини, гормони, аскорбінова кислота, ранева поверхня.

Filipova L., Matskevych V. Formation of phenolic substances by regenerants during the first subcultivations concerning the conditions and plant species

According to the following researches on the aseptic cultivation of *Thuja occidentalis* 'Smaragd' *Miscanthus giganteus*, *Sclerocactus spinosior*, the possibility of avoiding regenerants self-poisoning by phenolic substances is highlighted. The influence on the phenolic substances by plant species, hormones, ascorbic acid and size of damaged surface is determined. Changes in the nutrition environment to the first plant cultivation are suggested.

Key words: explant, regenerant, phenolic substances, hormones, ascorbic acid, damaged surface.

Филиппова Л., Мацкевич В. Образование регенерантами фенолоподобных веществ во время первых субкультивирований в зависимости от условий и вида растений.

На основании результатов исследований по асептическому выращиванию *Thuja occidentalis* 'Smaragd' *Miscanthus giganteus*, *Sclerocactus spinosior* показано возможность избежания самоотравления регенерантов фенолоподобными веществами. Определено влияние вида растений, гормонов, аскорбиновой кислоты и

размера раневой поверхности на образование этих веществ. Представлены изменения в прописях питательной среды для первых культивирований растений.

Ключевые слова: эксплант, регенерант, фенолоподобные вещества, гормоны, аскорбиновая кислота, раневая поверхность.