

10. Moreau P., Bessoule J. J., Mongland S. et al. Lipids trafficking in plant cell // Prog. Lipid Res. – 1998. – **37**. – P. 371–391.
11. Selstam E., Jackson A. O. Lipid composition of sonchus yellow net virus // Gen. Virology. – 1983. – **64**. – P. 1607–1613.
12. Machamer C. F., Guan J.-L., Rose J. K. Role of glycosylation in protein transport to the cell surface // Virus Res. – 1985. – **3**, Sup. No 1.
13. Диденко Л. Ф., Максименко Л. А., Пархоменко Н. И., Варбанец Л. Д., Броварская О. С., Зарицкий Н. М., Дяченко Н. С. Изучение липидов и углеводов в составе вируса курчавой карликовости картофеля (ВККК). III Міжнар. конф. “Біоресурси та віруси”, 11–15 вер. 2001 р. – Київ, 2001. – С. 69.
14. McSharry J. J., Wagner R. R. Carbohydrate composition of vesicular stomatitis virus // Virology. – 1971. – **7**. – P. 412.
15. Adam G., Heegard P., Bog-Harse T. C., Mundry K. W. Lectins as probed for the assay of rhabdoviruses infection in plants // Virol. Methods. – 1987. – **17**, No 3/4. – P. 263–275.

Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного, Київ

Надійшло до редакції 15.11.2006

УДК 634.75:518.143.6.1.051

© 2007

О. В. Колесніченко, А. А. Ключаденко, М. Д. Мельничук,
член-кореспондент НАН України **І. П. Григорюк, П. П. Яворовський,**
Сонг Фуджянг

Біотехнологічні аспекти введення в культуру *in vitro* каштана їстівного (*Castanea sativa* Mill.)

The conditions of the introduction of Castanea sativa Mill. in culture in vitro have been determined. The structure of sterilizing materials, concentration, and duration of their influence on the initial explants have been established. Specific culture media have been developed for the plants regeneration and for the callus formation. Regenerated plants and callus are obtained for the further study of rhizogenesis and indirect morphogenesis.

Значна кількість рослин каштана їстівного (*Castanea sativa* Mill.) поступово вичерпує свій адаптивний потенціал і гине від промислового забруднення хімічними речовинами, хвороб, шкідників, посухи тощо [1]. Особливо це стосується великих міст і промислових регіонів, де антропогенний вплив на довкілля перевищує гранично допустимі норми. Розмноження каштана їстівного, одного із основних постачальників кисню для мегаполісів, здійснюють генеративним (насінням) і вегетативним способами (вкоріненням пневої порослі та щепленням). Однак при розмноженні насінням найцінніші ознаки не завжди передаються нащадкам. Тому в останнє десятиріччя спостерігається тенденція постійної заміни насінневого розмноження окремих видів деревних рослин клональним мікророзмноженням у культурі *in vitro* [2]. У теперішній час визнано, що саме метод мікроклонального розмноження дозволяє найповніше реалізувати морфогенетичний потенціал рослинного організму. Використання методу культури *in vitro* відіграє ключову роль в оздоровленні рослин від патогенів, особливо вірусних, та уникненні дефектних ознак, які сконцентровано у генотипі за дії негативних мутацій, хвороб або патогенних організмів [3]. Особливо актуальним такий спосіб

оздоровлення та прискороного розмноження рослин каштана їстівного стає через значне поширення в Європі та Азії грибного захворювання крифонектрії (*Cryphonectria parasitica* (Murr.)).

З огляду на вищесказане метою нашого дослідження було підібрати оптимальні умови і живильні середовища й отримати вихідний садивний матеріал, вільний від грибної, бактеріальної та вірусної інфекцій, а також з підвищеною стійкістю до несприятливих умов навколишнього природного середовища. У роботі використано класичні біотехнологічні методи, а саме мікроклональне розмноження каштана їстівного (*Castanea sativa* Mill.) у культурі *in vitro*.

Об'єктом досліджень обрано дозріле насіння каштана їстівного, яке збирали в період повної стиглості в 2005–2006 рр. у Чжецзянському лісотехнічному університеті (провінція Ханчжоу, Китай). Як первинний експлантат використовували апікальні меристеми насінин та частини зародка. Підготовку рослинного матеріалу до дослідження здійснювали за методикою Р. Г. Бутенко [4], а його стерилізацію — шляхом промивання насіння проточною і дистильованою водою з подальшою обробкою полум'ям спиртівки. Зародки з плодів виділяли і поміщали в асептичні умови в ламінарних боксах. Відомо, що живильні середовища паралельно є гарним субстратом для розвитку бактеріальної та грибкової мікрофлори, тому рослинний матеріал каштана утримували в стерильному стані. З цією метою нами використано розчини сулеми (HgCl_2) та хлораміну в різних концентраціях.

Живильні середовища стерилізували в автоклаві при 0,1 МПа і 105 °С протягом 20 хв. Рослинні експлантати *in vitro* вирощували при температурі 24 °С (день) і 20 °С (ніч), 15-годинному освітленні (3 тис. лк) та відносній вологості повітря 70%. Експлантати висаджували на безгормональні живильні середовища, до складу яких входили макро- (у половинній концентрації) і мікроелементи [3], мг/л: NH_4NO_3 — 825; KNO_3 — 950; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 220; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 185; $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ — 18,65; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 13,9; H_3BO_3 — 6,2; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 22,3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 8,6; KI — 0,83; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,25; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,025; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,025; сахароза та агар.

Після отримання стерильних експлантатів їх переносили на живильні середовища МС [5], що містили макро- і мікросолі у концентраціях, мг/л: NH_4NO_3 — 1650; KNO_3 — 1900; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 440; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 370; $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ — 37,3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 27,8; H_3BO_3 — 6,2; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 22,3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 8,6; KI — 0,83; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,25; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,025; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,025; вітаміни [6], а також сахароза, агар, фітогормони у підібраних нами експериментально кількостях та співвідношеннях. Як гормони використовували гіберелову кислоту (ГК), індолілмасляну кислоту (ІМК) та 6-бензиламінопурин (6-БАП). У процесі культивування визначали кількість стерильних експлантатів залежно від процедури стерилізації. Вивчення стерилізуючої дії різних чинників проводили на 30 пробірках (10 пробірок у трикратній повторності). Результати дослідів обробляли статистично і визначали середні значення, стандартні похибки та вірогідні різниці за критерієм Стьюдента [7].

Оптимальний вихід стерильних первинних експлантатів зафіксовано при використанні розчину хлораміну в концентрації одна частина препарату, розчиненого в одній частині води (табл. 1). Найоптимальніший ефект стерилізації досягнуто за умов застосування 50%-го водного розчину хлораміну. Вихід стерильних первинних експлантатів у цьому варіанті дослідів становив $(62,1 \pm 3,0)\%$. Використання промислового розчину хлораміну приводило не тільки до високого стерилізуючого ефекту, але, як показали подальші дослідження, й інтенсивнішого розвитку стерильних експлантатів. Розчин сулеми в концентрації 0,1%



Рис. 1. Стерильні первинні експлантати каштана їстівного на агаризованому живильному середовищі



Рис. 2. Мікропагін каштана їстівного в культурі in vitro

виявився фітотоксичним і пригнічував подальший розвиток стерильних експлантатів каштана їстівного.

У наших експериментах на 10-ту добу отримано стерильні первинні експлантати каштана їстівного (рис. 1).

Після добору ефективного стериліанта, який дав змогу отримати найбільший відсоток стерильних і морфогенетично здатних експлантатів, перед нами постало питання стосовно активації меристеми й зародка в рослинному матеріалі.

Важливим аспектом роботи був підбір складу та співвідношення фітогормонів у живильному середовищі. Відомо, що ауксини індукують утворення ембріодів, а цитокініни — розвиток пазушних бруньок і утворення пагонів у калюсних культур [8]. Гібереліни синтезуються в основному в ембріональних клітинах — апексах кореня і стебла, листках, що ростуть, та насінинах у стадії формування [9].

Культивування асептичних зародків проводили в безгормональному живильному середовищі [5]. Первинні експлантати являють собою зародок, оточений ендоспермом (15–20%

Таблиця 1. Умови стерилізації первинних експлантатів каштана їстівного

Стерилізуюча речовина	Концентрація стерилізуючої речовини	Час стерилізації, хв	Вихід стерильних експлантатів, %
Сулема (HgCl ₂)	0,1%	5	34,5 ± 1,6
Розчин хлораміну	1 ч. + 3 ч. H ₂ O	10	51,0 ± 2,4*
Розчин хлораміну	1 ч. + 1 ч. H ₂ O	10	62,1 ± 3,0*

*Різниця між варіантами дослідів статистично достовірна за критерієм Стьюдента при рівні значущості $P \leq 0,05$.

ендосперму від загального об'єму плоду), що і давало йому змогу проявляти морфогенетичну активність без додавання додаткових стимуляторів росту. З метою отримання достовірніших результатів нами випробувані живильні середовища з вмістом різних концентрацій ГК (0,5–1,5 мг/л) для прискорення збудження та активного росту меристеми. На всіх варіантах живильних середовищ спостерігали аналогічний ефект, тому використання ГК в подальшому виявилось не доцільним.

Активацію меристем каштана нами зафіксовано на 8-му — 12-ту добу культивування. Спочатку фіксували розвиток листкових пластинок, які змінювали забарвлення від світло-жовтого до зеленого кольору. Потім відбувався посилений ріст пагона каштана з добовим приростом 2–3 мм. Ріст та розвиток експлантатів припинявся на 23-тю — 35-ту добу культивування. Протягом даного періоду рослина каштана сформувала два оптимально розвинуті листка і стебло завдовжки 2,5–3 см та діаметром 1,5–3 мм (рис. 2).

У переважній більшості експлантатів зафіксовано формування кореневої системи у вигляді одного потужного кореня та вторинних бічних. Подальше культивування до 30 діб індукувало часткову загибель рослини чи втрату (всихання) листкових пластинок. При цьому експлантат не розвивався, верхівкова меристема не проявляла активності. Наявні результати свідчать про можливість одержання регенерації та розвитку зародка на безгормональному живильному середовищі [5] за умов культивування не більше 25 діб. Частина стерильних і оптимально розвинених пагонів каштана їстівного використана для вивчення морфогенетичної активності тканин органів та отримання значної кількості рослинного матеріалу.

Для нарощування вегетативної маси використовували базове живильне середовище [5] з додаванням БАП у чотирьох варіантах концентрацій: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мг/л.

Експлантати, отримані на безгормональному середовищі, розділяли на сегменти, які формували верхівкову бруньку, одну чи дві листкові пластинки та стебло розміром не більше 1 см. Такі сегменти культивували на запропонованих нами живильних середовищах протягом 30 діб. У процесі культивування спостерігали за формуванням довжини пагона, кількістю міжвузлів і активованих меристем, а також наявністю калюсу та кольором експлантата. На 3-тю — 5-ту добу культивування на всіх варіантах живильного середовища зафіксовано збільшення об'єму експлантатів і кількості листків (на першому варіанті середовища), потовщення основи пагона та активацію верхівкової меристеми. Активний ріст і розвиток пагонів відбувався протягом 8–20 діб культивування залежно від варіанта живильного середовища: I варіант — 10–14 діб, II — 8–18 діб, III — 8–20 діб, IV — 10–15 діб.

На першому і четвертому варіантах живильних середовищ експлантати розвивались повільно, при цьому приріст пагонів у середньому становив 1,0–1,5 см. В умовах культивування визначено поодинокий розвиток меристем, деформацію листкових пластинок (з 10-ї доби культивування) зі зміною кольору із зеленого до світло-жовтого і формування калюсу (10–15-та доба) на основі пагона, який на 15–20-ту добу культивування відмирав та набував темно-коричневого кольору (рис. 3, а, б).

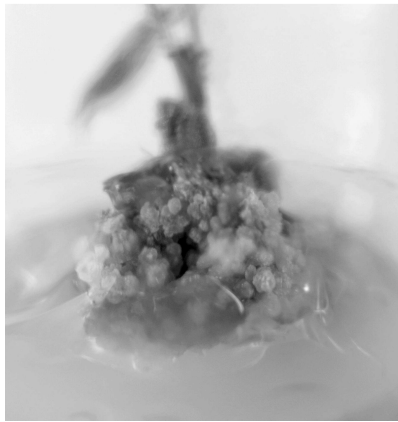
На другому і третьому варіантах живильних середовищ нами виявлено активний ріст та розвиток експлантатів каштана їстівного. Визначено зменшення рослин каштана їстівного (міжвузля — 0,8–1,0 см; листкові пластинки зменшувались у поперечному розмірі) у межах фенотипових ознак виду. Забарвлення пагонів і листків набувало зеленого кольору й не змінювалось протягом 25 діб культивування. Водночас довжина пагона становила на другому варіанті середовища 4,0–4,5 см, на третьому — 4,0–5,0 см і формувалося 4–6 міжвузлів



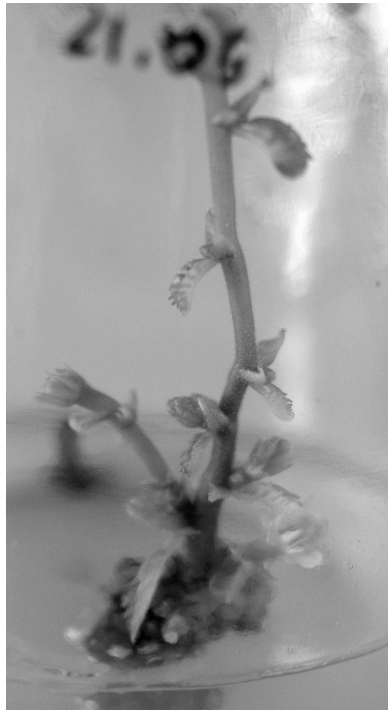
a



б



в



г

Рис. 3. Розвиток експлантатів каштана їстівного при вирощуванні на різних варіантах живильних середовищ (опис варіантів див. у тексті):

a — деформація листової пластинки мікропагона (I, IV варіанти); *б* — загибель регенеранту на 20-ту добу (I, IV варіанти); *в* — формування калюсу біля основи пагона на 15-ту добу (II, III варіанти); *г* — стерильні первинні експлантати на 20-ту добу (III варіант)

(рис. 4). У 80% експлантатів відбувалась проліферація калюсу, що відзначався щільною структурою та світло-зеленим кольором. Структура та забарвлення калюсу (див. рис. 3, *в*) свідчить про його морфогенетичну здатність до регенерації повноцінної рослини, що може бути використано в дослідженнях щодо отримання каштана їстівного шляхом непрямого морфогенезу.

Головною відмінністю між двома запропонованими варіантами живильних середовищ була кількість активованих пазушних меристем на окремо взятому експлантаті каштана

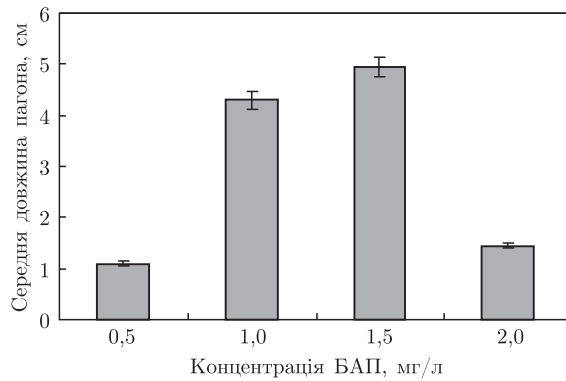


Рис. 4. Вплив концентрацій БАП на ріст пагонів каштана їстівного

їстівного (див. рис. 3, з). Так, на другому варіанті формувалися 1–2 меристеми, на третьому — 4–6. Таким чином, нами підібрано склад живильного середовища, яке є базовим для отримання значної кількості рослинного матеріалу каштана їстівного в умовах *in vitro* з типовими ознаками.

З'ясовано, що максимальний вихід стерильних первинних експлантатів спостерігається при використанні розчину хлораміну в концентрації одна частина препарату і одна частина води. Вихід стерильних експлантатів у цьому варіанті досліджу становив 62,1%. Як показали подальші експерименти, використання промислового розчину хлораміну приводило до високого стерилізуючого ефекту та інтенсивнішого утворення морфогенетично активних експлантатів. Максимальну кількість активованих пазушних меристем на одному мікропагоні виявлено на середовищі, що містило макро- і мікроелементи згідно з [5] із додаванням 1,5 мг/л БАП.

Отриманий нами вперше рослинний матеріал досліджується на ризогенну активність і фізіологічні аспекти культури тканин та органів каштана їстівного в культурі *in vitro*.

1. Григорюк І. П., Машковська С. П., Яворовський П. П., Колесніченко О. В. Біологія каштанів. – Київ: Логос, 2004. – 380 с.
2. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. – Київ: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
3. Бутенко Р. Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* // Чайлахян. Первое чтение. – Пушино: Пушин. НИЦ, 1994. – С. 7–26.
4. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – Москва: Наука, 1964. – 272 с.
5. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. plant.* – 1962. – 15, No 3. – P. 473–497.
6. Уайт Ф. Р. Культура растительных тканей. – Москва: Изд-во иностр. лит., 1949. – 150 с.
7. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1980. – 150 с.
8. Калинин Ф. Л., Кушир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наук. думка, 1992. – 232 с.
9. Бутенко Р. Г. Перспективы использования культивирования клеток растений в биотехнологии // *Биотехнология.* – Москва: Наука, 1984. – С. 239–247.

Національний аграрний університет, Київ
 Чжецзянський лісотехнічний
 університет, Китай

Надійшло до редакції 13.12.2006