

УДК: 631.53:57.085.23(634.232)

**Н. Ю. ВИСОЦЬКА\***  
**МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ *CERASUS AVIUM* (L.) MOENCH**  
**У КУЛЬТУРИ *IN VITRO***

*Український науково-дослідний інститут лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г.М. Висоцького*

У статті розглянуто особливості мікроклонального розмноження черешні (*Cerasus avium* (L.) Moench). Відмічено високу ефективність методики стерилізації маточного матеріалу для введення в культуру *in vitro*, розробленої лабораторією селекції УкрНДІЛГА ім. Г.М.Висоцького у попередні роки. Досліджено динаміку морфогенезної активності та інтенсивність пагоноутворення експлантів *C. avium*, Джерелом експлантів були зелені незадерев'янілі пагони, які зрізали безпосередньо в лабораторних умовах з контейнерних рослин, та верхівкові меристеми з пагонів черешні, заготовлених у насаджені до початку вегетаційного періоду. З метою виявлення впливу апікального домінування на інтенсивність пагоноутворення обліки проводили окремо для термінальних і аксиларних бруньок. Морфогенезна активність експлантів, джерелом яких були як зелені незадерев'янілі пагони так і верхівкові меристеми, була доволі високою (60,8 до 100 %) незалежно від типу фітогормонів. Достовірної різниці за інтенсивністю пагоноутворення між експлантами з термінальних і аксиларних бруньок, джерелом яких були зелені незадерев'янілі пагони, у культурі *in vitro* не виявлено. Найвищий коефіцієнт мультиплікації матеріалу (1,4) відмічено на середовищі MS з додаванням БАП у концентрації 0,3 мг/л.

**К л ю ч о в і с л о в а :** мікроклональне розмноження, *in vitro*, *Cerasus avium*.

Останнім часом все більше уваги прикуто до проблем збереження біорізноманіття та раціонального використання природних ресурсів. Серед багатьох видів, що ростуть в лісових екосистемах, великий інтерес викликає черешня (*Cerasus avium* (L.) Moench), оскільки вона є однією із найбільш цінних деревних і плодкових рослин, але в Україні поширена на обмеженій території. Черешня відіграє роль супутньої породи у природних дубових та букових деревостанах в Українських Карпатах та гірському Криму, її участь у складі становить від 5 до 30 % [3]. Поодинокі трапляється у лісах Лісостепу та Полісся.

Цінність деревини *C. avium* обумовлена унікальним рожевувато-коричневим або рожевувато-сірим кольором теплого відтінку та виразною текстурою, що є надзвичайно цінним для виробників високоякісних меблів та різьблених виробів. Попри те, що пропозиція високоякісної деревини черешні залишається доволі бідною, а ціни на неї зросли до надзвичайно високого рівня, на європейському ринку відмічено високий попит на цей вид продукції. Слід зазначити, що при відтворенні штучним шляхом лісів, в яких черешня росла природно, пріоритетним завданням є створення культур головних лісоутворювальних порід, а відновлення черешні відбувається лише з поодиноких екземплярів самосіву. Отже, важливого значення набуває вирішення проблеми нормалізації балансу між споживанням деревини і відновленням черешні у лісах, одним зі шляхів подолання якої є створення цільових плантацій, що допоможе значно збільшити обсяги виробництва цінної деревини.

Окрім лісівничого значення *C. avium* відіграє важливу роль для плідництва, оскільки культурні сорти вишні і черешні, щеплені на підщепах черешні дикої, вирізняються стійкістю проти несприятливих чинників і мають добру сумісність. На жаль, цей спосіб розповсюджений мало через відсутність достатньої кількості дерев для заготівлі насіння.

Існує низка робіт [2, 5], що стосуються мікроклонального розмноження кісточкових плодкових культур, але кожний окремий випадок потребує розробки адаптованого протоколу, оскільки з біологічної точки зору цей процес є дуже складним – суттєвого впливу завдають генотип рослин, фізіологічний стан, умови росту маточної рослини, склад поживних середовищ, освітлення, температурний режим та інші чинники. Відомо, що найлегше досягнути морфогенезу при використанні 1–3-річних сіянців та зародків, а матеріал, джерелом якого є старі дерева, є найскладнішим для введення в культуру *in vitro* [10], проте перевагою мікроклонального розмноження є здатність рослин до реювенілізації [11].

\* © Н. Ю. Висоцька, 2014

Отже, вирішення проблеми масового виробництва якісного садивного матеріалу для створення плантаційних культур та вирощування підщеп з метою створення плодкових садів вбачається у розробці методики розмноження найкращих екземплярів *C. avium* в умовах *in vitro* або у коригуванні існуючої залежно від індивідуальних особливостей.

Склад базового середовища є вирішальним у визначенні росту тканин деревних рослин *in vitro*. Для мікроклонального розмноження кісточкових плодкових культур використовують середовища Готре, Уайта, Хеллера. Але найбільш оптимальним є поживне середовище Мурасиге Скуга (MS) [8, 9].

Для росту і диференціації ізольованих рослинних клітин і тканин використовують екзогенні регулятори росту: цитокініни і ауксини. На етапі введення в культуру *in vitro* використовують 6-бензиламинопури (БАП) у концентраціях 0,2–0,5 мг/л [4]. Наявність цитокінінів у складі поживного середовища в умовах *in vitro* нівелює апікальне домінування. Для індукції проліферації аксілярних бруньок з метою отримання максимального числа пагонів мікророслини черешні культивують із додаванням БАП у концентраціях 0,5–2 мг/л [4, 8]. Ауксини використовують для отримання і підтримання культури тканин кісточкових, індукції клітинного поділу і диференціації, регуляції регенерації пагона, активації процесу утворення коренів. Серед ауксинів найчастіше використовують β-індолілоцтова кислота (ІОК) у концентраціях 1–30 мг/л.

**Мета роботи** – оптимізувати технологію мікроклонального розмноження *C. avium* та виявити оптимальні умови росту і розвитку рослин у культурі *in vitro* при використанні в ролі маточного матеріалу зелених незадерев'янілих пагонів, термінальних і аксілярних бруньок та найбільш ефективного середовища ініціації.

**Об'єкти і методика.** Процес мікроклонального розмноження кісточкових порід складається з низки послідовних операцій, кожна з яких має свою специфіку. Подана робота присвячена визначенню методики стерилізації маточного матеріалу різного походження, а також оптимальних умов введення, росту, розвитку і мікроживцювання рослин *C. avium* у культурі *in vitro*.

Об'єктом досліджень були дерева черешні (*Cerasus avium* (L.) Moench), що росли в природних деревостанах в Українських Карпатах. Для клонального мікророзмноження випробовували два типи маточного матеріалу: сіянці, які росли у контейнерах, та зрізані пагони з дорослих дерев.

У першому випадку як джерело експлантів для введення в культуру *in vitro* використовували зелені незадерев'янілі пагони *C. avium* (С-I), заготовлені безпосередньо в лабораторних умовах з контейнерних рослин.

У другому випадку як джерело експлантів використовували пагони черешні, заготовлені до початку вегетаційного періоду (лютий – березень). Для введення в культуру *in vitro* використовували верхівкові меристеми з термінальних і аксілярних бруньок (С-II).

Для стерилізації маточного матеріалу С-I було використано концентрації дезінфікуючих реактивів згідно з методикою, розробленою у попередні роки [1]. На першому етапі стерилізації матеріал відмивали у проточній воді з використанням побутових миючих засобів. На другому етапі для промивання та 5-хвилинної стерилізації матеріалу використовували концентрований розчин гіпохлориту натрію та синтетичних детергентів, розведений дистильованою водою у співвідношенні 1 : 3. Після обробки матеріал тричі промивали стерильним дистилатом. На третьому етапі проводили 5-хвилинну обробку матеріалу 70 % етанолом, з обов'язковим триразовим споліскуванням стерильним дистилатом.

На першому етапі стерилізації маточного матеріалу С-II проведено відмивання у проточній воді з використанням побутових миючих засобів. Другим етапом була 5-хвилинна обробка матеріалу 70 % етанолом з триразовим споліскуванням стерильним дистилатом.

Зелені незадерев'янілі пагони в ламінар-боксі розрізали на сегменти і уводили в стерильну культуру.

Після стерилізації рослинного матеріалу С-II проводили видалення верхівкової меристеми за загальноприйнятими методиками [6]. У стерильних умовах бруньки ретельно очищували від брунькових лусочок і висаджували на середовище ініціації.

Для введення *S. avium* у культуру *in vitro* використовували базове середовище MS, до якого додавали 6-бензиламинопурин (БАП) у концентрації 0,3 мг/л та  $\beta$ -індолілоцтову кислоту (ІОК) у концентрації 0,05 мг/л.

Після садіння на поживне середовище ініціації експланти витримували 3–4 доби у темряві за температури +23°C, потім переносили у світлову кімнату з такою ж температурою, освітленням близько 1500 люкс/м<sup>2</sup> і світловим режимом 16 годин – день / 8 годин – ніч. Кожні 14 діб проводили облік морфогенезної активності експлантів, відмічали загибель експлантів у результаті всихання або внаслідок занесення на поживне середовище грибової або бактеріальної інфекції, коефіцієнт мультиплікації (множення) та утворення пагонів.

Експланти пересаджували з виснаженого середовища на нове кожні 4 тижні. Після досягання пагонами довжини 1,5–3 см та утворення сформованих листочків або численних адвентивних бруньок їх використовували для мультиплікації, а саме розрізали на сегменти з 1–2 міжвузлями та знову висаджували на відповідне середовище ініціації.

**Результати і обговорення.** Введення експлантів у культуру *in vitro* є найбільш відповідальним етапом клонального мікророзмноження. За літературними даними [7], максимальне інфікування (більше ніж 50 %) є характерним для експлантів, виділених навесні. Нашими попередніми дослідженнями з мікроклонального розмноження листяних деревних видів встановлено, що пагони, заготовлені у грудні – січні, є більш придатним вихідним матеріалом для введення в культуру *in vitro* ніж пагони, заготовлені у лютому – березні, оскільки навесні покривні лусочки на бруньках поступово починають розкриватися, тим самим сприяючи проникненню бактеріальної мікрофлори та грибних спор до апікальних меристем.

Кількість стерильних експлантів С-I у культурі *in vitro* сягала 100 %. На 14 добу ініціації відмічено незначну кількість рослин, що всохли (8,6 %). Однією з причин всихання експлантів можуть бути опіки ранової тканини, викликані детергентами під час стерилізації матеріалу. Результати стерилізації матеріалу С-II були значно гіршими, частка стерильних експлантів становила лише 66 % загальної кількості висаджених рослин, відзначено ураження бактеріальною інфекцією.

Морфогенезна активність експлантів С-I у культурі *in vitro* була високою на середовищі MS з додаванням БАП у концентрації 0,3 % і сягала 100 %. На середовищі MS із додаванням ІОК у концентрації 0,05 % цей показник був дещо гіршим (70,8–100 %), проте залишався доволі високим. Після шести тижнів культивування морфогенезна активність експлантів С-I сягала 100 % незалежно від типу фітогормонів (рис. 1).

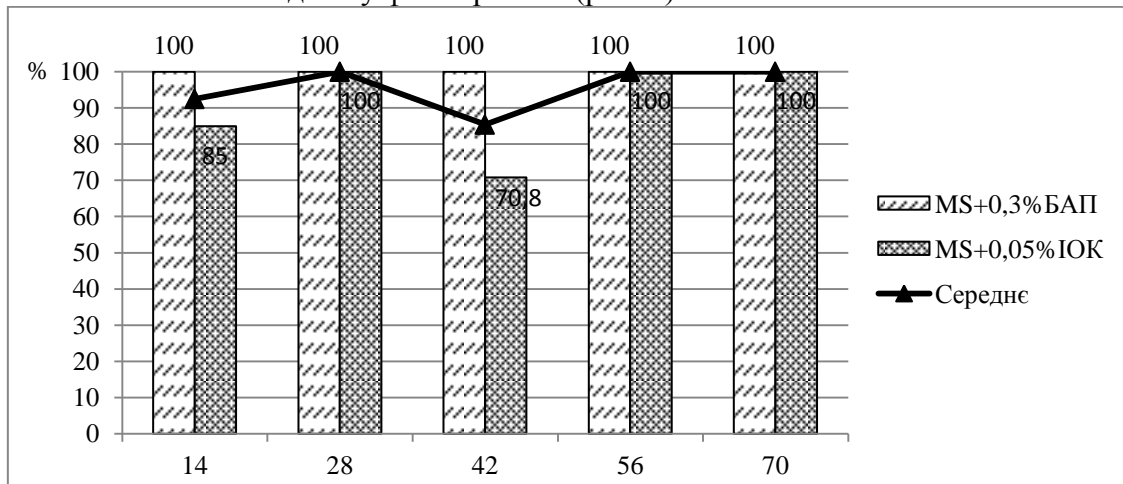


Рис.1 – Вплив типу фітогормонів на морфогенезну активність експлантів, джерелом яких були зелені незадерев'янілі пагони *S. avium* (у % від загальної кількості експлантів)

Морфогенезна активність експлантів С-II в культурі *in vitro* на середовищі MS з додаванням ІОК у концентрації 0,05% була високою протягом 70 діб. Відмічено зниження цього показника на 42 добу спостережень, що відбувалось переважно за рахунок всихання експлантів. Протягом чотирьох тижнів МА експлантів знизилась з 94,3 % до 75,8 %, після пересаджування на свіже середовище відбулось всихання частини матеріалу і показник набув значення 60,8 % (рис. 2). На 56 добу спостереження відмічено відновлення морфогенезу і активізацію ростових процесів на всіх середовищах незалежно від типу фітогормонів.

Дослідження показали, що морфогенезна активність експлантів, джерелом яких були як зелені незадерев'янілі пагони так і верхівкові меристеми з термінальних і аксиллярних бруньок, була доволі високою (60,8–100 %). Після 56-ти діб спостережень цей показник сягав 100 % незалежно від типу фітогормонів.

Отже, найбільшу увагу слід приділяти показникам пагоноутворення та мультиплікації матеріалу.

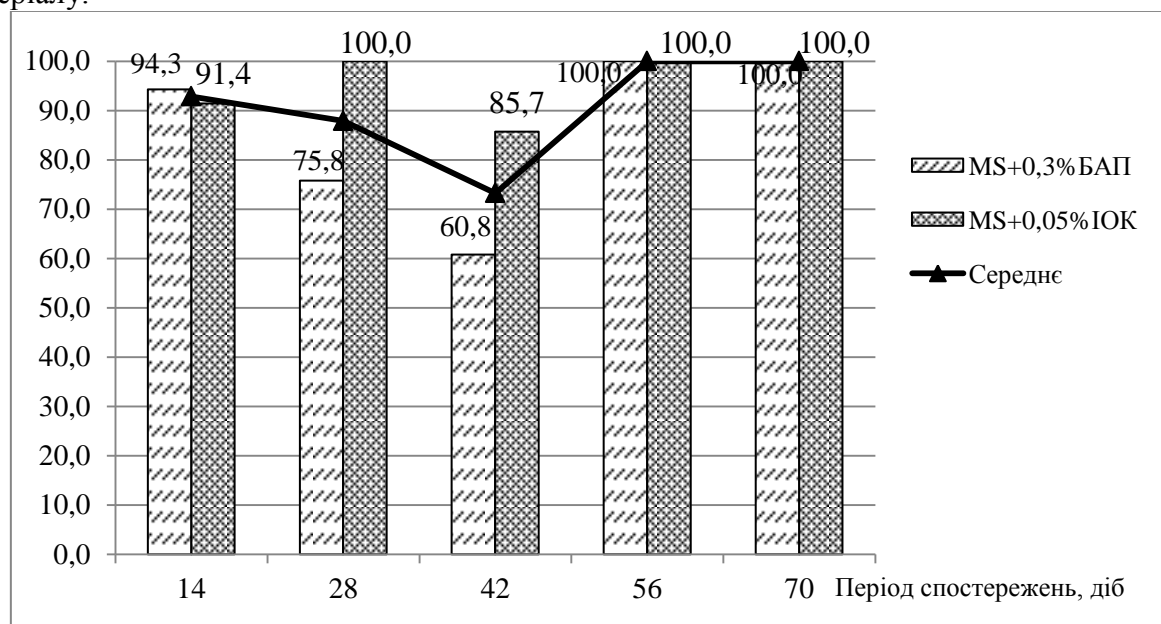
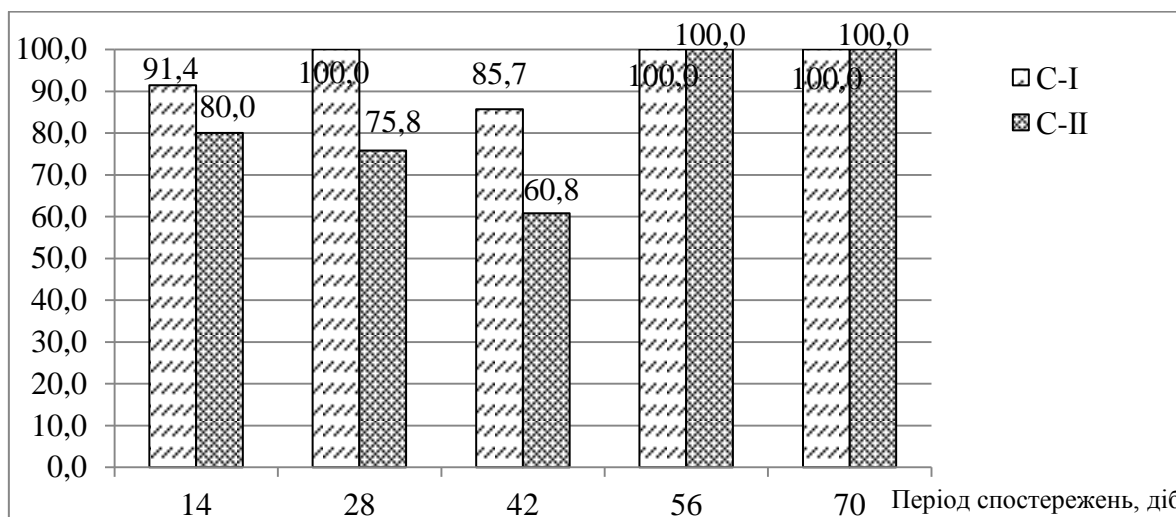


Рис. 2 – Вплив типу фітогормонів на морфогенезну активність верхівкових меристем з термінальних і аксиллярних бруньок *C. avium* (у % від загальної кількості експлантів)

За допомогою дисперсійного аналізу встановлено, що вплив типу маточного матеріалу на морфогенезну активність *C. avium* у культурі *in vitro* становить 34,3 %, вплив типу фітогормонів є незначним і становить лише 2 %.

Упродовж перших двох тижнів більшість експлантів (80–91,4 %) сформували добре видовжені пагони. Відмічено значне зниження інтенсивності утворення пагонів *C. avium* у культурі *in vitro* на шостому тижні спостережень у експлантів, джерелом яких були як зелені незадерев'янілі пагони (85,7 %), так і апікальні меристеми (60,8 %). Проте протягом двох місяців пагони сформувалися у 100 % експлантів незалежно від типу маточного матеріалу (рис. 3). Це пояснюється адаптацією до культуральних умов, яка включає окрім багатофакторної залежності від материнського організму для ювенільного матеріалу С-I процес реювенілізації матеріалу С-II, в результаті якого знижується вплив стрес-факторів, накопичених рослинами за весь період життя.

Інтенсивність пагоноутворення експлантів С-I з термінальних бруньок *in vitro* на 14 добу спостережень становила 100 % незалежно від типу фітогормонів. Інтенсивність пагоноутворення експлантів С-I з аксиллярних бруньок у цей період коливалася від 80 % (MS + 0,05 % ІОК) до 100 % (MS + 0,3 % БАП) (табл. 1). На 70 добу спостережень інтенсивність пагоноутворення у експлантів як з термінальних, так і з аксиллярних бруньок сягала 100 %.



**Рис. 3 – Вплив типу маточного матеріалу на інтенсивність пагоноутворення *C. avium* в умовах *in vitro* (у % від загальної кількості морфогенезноактивних експлантів)**

Таблиця 1

**Інтенсивність пагоноутворення експлантів *C. avium* залежно від місця розташування бруньки на пагоні та джерела експлантів, %**

Період спостережень, діб	Середовище ініціації	Джерело експлантів			
		C-I		C-II	
		Термінальні бруньки	Аксиллярні бруньки	Термінальні бруньки	Аксиллярні бруньки
14	MS + 0,3 % БАП	100	100	100	50
	MS + 0,05 % ІОК	100	80	100	80
70	MS + 0,3 % БАП	100	100	100	100
	MS + 0,05 % ІОК	100	100	100	100

Достовірної різниці за інтенсивністю пагоноутворення між експлантами C-I з термінальних та аксиллярних бруньок у культурі *in vitro* не виявлено. Вплив 6-бензиламинопурину на зменшення апікального домінування у експлантах, джерелом яких були сіянці *C. avium*, в умовах *in vitro* в наших дослідженнях статистично не підтверджено. За допомогою дисперсійного аналізу встановлено, що вплив типу фітогормонів, місця розташування бруньки на пагоні, а також випадкових чинників на інтенсивність пагоноутворення є рівнозначним. У наведеному випадку апікальне домінування знівельоване ювенільним походженням матеріалу та оптимальними концентраціями екзогенних регуляторів росту.

Інтенсивність пагоноутворення експлантів C-II з термінальних бруньок *in vitro* на 14 добу спостережень становила від 50 % (MS + 0,3 % БАП) до 80 % (MS + 0,05 % ІОК). За допомогою дисперсійного аналізу встановлено, що на 14 добу спостережень вплив типу фітогормонів на інтенсивність пагоноутворення є вирішальним і сягає 73,1 %. На 70 добу спостережень інтенсивність пагоноутворення у експлантів як з термінальних, так і з аксиллярних бруньок сягала 100 %.

Для всіх варіантів досліду було підраховано коефіцієнт мультиплікації і виявлено, що найкращим він був на середовищі MS з додаванням БАП у концентрації 0,3 мг/л і становив 1,4 як для матеріалу C-I, так і для C-II.

**Висновки.**

Морфогенезна активність експлантів, джерелом яких були як зелені незадерев'янілі пагони, так і апікальні меристеми з термінальних і аксиллярних бруньок, була доволі високою незалежно від типу фітогормонів і коливалася в межах від 60,8 до 100 %.

Вплив 6-бензиламинопурину на зменшення апікального домінування у експлантах, джерелом яких були зелені незадерев'янілі пагони з сіянців *C. avium*, в умовах *in vitro* в

наших дослідженнях статистично не підтверджено. Вплив типу фітогормонів, місця розташування бруньки на пагоні, а також випадкових чинників на інтенсивність пагоноутворення є рівнозначним. Апікальне домінування знівелюване ювенільним походженням матеріалу та оптимальними концентраціями екзогенних регуляторів росту.

Вплив типу фітогормонів на інтенсивність пагоноутворення експлантів, джерелом яких були термінальні бруньки зі зрізаних пагонів, мав вирішальне значення протягом перших двох місяців культивування в умовах *in vitro*, на 70 добу спостережень інтенсивність пагоноутворення у експлантів як з термінальних, так і з аксиллярних бруньок сягала 100 %.

Найвищий коефіцієнт мультиплікації матеріалу (1,4) відмічено на середовищі MS з додаванням БАП у концентрації 0,3 мг/л

Отримані дані з клонального мікророзмноження *Cerasus avium* можуть застосовуватися для відновлення природних популяцій виду при лісовідтворенні, збереження цінних генотипів, масового виробництва високоякісного садивного матеріалу для створення плантаційних культур та вирощування підщеп з метою створення плодкових садів.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вдосконалити систему збереження і невиснажливого використання генетичного різноманіття лісових порід : Науковий звіт за 2004 рік (проміжн.) за темою №5 / УкрНДЛГА. – Х., 2004. – 240 с.
2. *Высоцкий В. А.* Регенерационная способность *in vitro* эксплантов различного происхождения плодовых и ягодных растений / В. А. Высоцкий, Л. В. Алексеенко // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология : IX Междунар. конф., Звенигород, 8-12 сентября 2008 г. : тезисы докл. – М. : ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. – С. 82–84.
3. *Гамор А. Ф.* *Cerasus avium* (L.) Moench в Українських Карпатах: морфолого-біологічні особливості та поширення : автореф. дис. на здобуття наук ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.05 «Ботаніка» / А. Ф. Гамор. – К., 2003. – 18 с.
4. *Корнацкий С. А.* Проблемы клонального микроразмножения косточковых культур / С. А. Корнацкий, В. А. Высоцкий, В. Г. Трушечкин // Достижения в плодоводстве в Нечерноземной зоне РСФСР. – М., 1991. – С. 104–116.
5. *Кузнецова Н. В.* Изучение регенерационной способности четырех сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условиях *in vitro* / Н. В. Кузнецова, О. В. Митрофанова // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология : IX Междунар. конф., Звенигород, 8–12 сентября 2008 г. : тез. докл. – М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. – С. 212–214.
6. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / [под ред. Е. Н. Джигадло]. – Орел, 2005. – 50 с.
7. *Михальчик Л. С.* Размножение яблони и вишни методом *in vitro* / Л. С. Михальчик, В. И. Деменко // ТСХА, 1988. – № 14/66. – ВС-89. – С. 649–657.
8. *Олешко Е. В.* Особенности клонального микроразмножения подвоев и сортов вишни: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук : спец. 03.00.05 «Ботаника» / Е. В. Олешко. – М., 1985. – 15 с.
9. *Шипунова А. А.* Клональное микроразмножение плодовых растений : автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. с.-х. наук : спец. 06.01.07 «Плодоводство» / А. А. Шипунова. – М., 2003. – 24 с.
10. *George, Edwin F.* Plant propagation by tissue culture: In practice. Pt. 2 / Edwin F. George. – 2-nd ed. – Exgenetics Ltd., 1996. – 799 p.
11. *Gupta P. K.* Tissue culture of forest trees – clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook. by tissue culture / P. K. Gupta, A. F. Mascarenhas, V. Jagannathan // Plant Sci. Lett. – 1981. – V. 20, No 3. – 195–201.

Vysotska N. Yu.

#### MICROPROPAGATION OF *CERASUS AVIUM* (L.) MOENCH *IN VITRO*

*Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Melioration named after G. M. Vysotsky*

The paper deals with peculiarities of micropropagation of cherry (*Cerasus avium* (L.) Moench). The potential for initiating and proliferating of shoot cultures derived from *C. avium* and a micropropagation method for these species was developed. The high efficiency of the method for the foundation stock sterilization for introduction into culture *in vitro* developed by Laboratory of Forest Tree Breeding of URIFFM earlier was identified. Shoot apices and axillary buds were collected in laboratories from greenhouse-grown one-year-old trees of cherry. Nodal segments, 0,5-1 cm in length, without leaves were then excised from the shoots. The effects of different plant growth regulators in micropropagation and medium that encourages axillary bud development were investigated. In order to identify the influence of apical dominance on the intensity of formed shoots surveys separately for the terminal and axillary buds are being conducted. Morphogenesis activity for explants of green nodal segments of shoots and apical meristem was high (60.8 to 100 %) regardless of the type of phytohormones. In proliferation stage, multiplication rate of about 1,4 was achieved over a 8 week period using MS medium with 0,3 mg l<sup>-1</sup> 6-Benzylaminopurine.

**К е у w o r d s :** micropropagation, *in vitro*, *Cerasus avium*.

Высоцкая Н. Ю.

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *CERASUS AVIUM* (L.) MOENCH В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

*Український научно-дослідницький інститут лісного господарства і агролісомеліорації ім. Г. Н. Высоцького*

В статье рассмотрены особенности микроклонального размножения черешни (*Cerasus avium* (L.) Moench). Отмечена высокая эффективность методики стерилизации маточного материала для введения в культуру *in vitro*, разработанной лабораторией селекции УкрНИИЛХА им. Г. Н. Высоцкого в предыдущие годы. Исследована динамика морфогенезной активности и интенсивности побегообразования эксплантов *C. avium*, источником которых были зеленые неодревесневшие побеги, заготовленные непосредственно в лабораторных условиях с контейнерных растений, и верхушечные меристемы из побегов черешни, заготовленных в насаждениях до начала вегетационного периода. С целью выявления влияния апикального доминирования на интенсивность побегообразования учеты проводили отдельно для апикальных и пазушных боковых почек. Морфогенезная активность эксплантов, источником которых были как зеленые неодревесневшие побеги, так и верхушечные меристемы, была довольно высокой независимо от типа фитогормонов и колебалась в пределах от 60,8 до 100 %. Достоверной разницы по интенсивности побегообразования между эксплантами из апикальных и боковых почек, источником которых были зеленые неодревесневшие побеги, в культуре *in vitro* не выявлено. Самый высокий коэффициент мультипликации материала (1,4) отмечен на среде MS с добавлением БАП в концентрации 0,3 мг/л.

К л ю ч е в ы е с л о в а : микроклональное размножение, *in vitro*, *Cerasus avium*.

*E-mail: vs@uriffm.org.ua*

*Одержано редколегією 20.10.2014*