

УДК 57.085.2 : 582.736.3.

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН TRIFOLIUM PRATENSE L.

Денчиля-Сакаль Г. М., Ніколайчук В. І., Терек В. О.

Мікроклональне розмноження рослин *Trifolium pratense* L. — Г. М. Денчиля-Сакаль, В. І. Ніколайчук. — Досліджено особливості мікроклонального розмноження рослин *Trifolium pratense* L. в умовах культури *in vitro*, стерилізації рослинного матеріалу, підбору та модифікації живильних середовищ з метою одержання рослин-регенерантів, придатних для використання в умовах *in vivo*.

Ключові слова: калусоутворення, органогенез, вплив фітогормонів.

Адреса: Ужгородський національний університет, кафедра генетики, фізіології рослин та мікробіології; вул. Волошина, 32, Ужгород, 88000.

Microclonal reproduction of *Trifolium pratense* L. plants. — H. Denchilja-Sakal, V. Nikolaychuk. — The effects of microclonal cloning of the *Trifolium pratense* L. plants in the *in vitro* culture are investigated. Sterilization data of plant material, selection and modification of nutrient mediums to get plants-regenerants which can be used in the *in vivo* conditions are stated.

Key words: callus formation, organogenesis, effect of phytohormones.

Address: Uzhgorod National University; Department of genetics, phytophysiology and microbiology; Voloshyn str., 32, Uzhgorod, 88000.

Вступ

Метод культури клітин, тканин, і органів нині широко впроваджується в багатьох країнах світу для розв'язання проблем сучасної селекції. Біотехнологічні підходи використовують для збереження, прискореного розмноження й тиражування унікальних, цінних та сільськогосподарських культур [1].

В Україні теоретичні і методичні дослідження у галузі біотехнології сільськогосподарських рослин проводять у кількох напрямках: мікроклональне розмноження (МКР), оздоровлення рослин, клітинна селекція, прискорення селекційного процесу [3].

Застосування біотехнології у сільськогосподарському рослинництві дає змогу отримати нові високоврожайні сорти, стійкі до хвороб і несприятливих ґрунтових та кліматичних умов [4]. Мікроклональне розмноження бобових застосовують головним чином для полегшення гібридизації, генної трансформації або збільшення генетичної мінливості. Культура меристематичних аспектів сприяє звільненню материнських рослин від вірусів. Регенерація рослин відбувається переважно через калусну культуру [2, 3].

Метою нашої роботи було опрацювання технології мікроклонального розмноження *Trifolium pratense* L. (Fabaceae); підбір оптимальних варіантів стерилізації рослинного матеріалу та живильних середовищ; отримання достатньої кількості морфологічно однорідного посадкового матеріалу й подальша його постасептична адаптація.

Матеріали та методи досліджень

В якості об'єкту досліджень нами було вибрано *T. pratense*, як високобілкову кормову культуру перспективну для Закарпаття. Насіння висівали в

чашки Петрі на фільтрувальному папері, (по 25 шт.) і пророщували при температурі 22±24°C. Паростки конюшини з'являлися на 3 добу від початку пророщування.

Рослинний матеріал досліджуваних рослин замочували в 2% розчині хлораміну протягом 5 хв., потім 2–3 рази промивали дистильованою водою і висаджували на поживне середовище.

Основним середовищем для формування і подальшого розмноження конюшини було модифіковане середовище Мурасіга-Скуга. Поживне середовище готували, змінюючи співвідношення компонентів вже готових розчинів макро- і мікросолей, вуглеводів, вітамінів.

У роботі використовували методи культури рослинних тканин та індукції морфогенних процесів *in vitro*. Рослинний матеріал культивували в пробірках об'ємом 100 мл при люмінесцентному освітленні, температурі 24–25°C і відносній вологості повітря 70%.

В кожному варіанті досліді з трьохкратною повторністю використовували по 20–25 експлантів. Аналіз проводили через 3 тижні культивування.

Результати досліджень та їх обговорення

Технологічний процес мікроклонального розмноження рослин *T. pratense*, в культурі *in vitro* включав декілька послідовних етапів: стерилізацію рослинного матеріалу, введення в культуру, підбір та оптимізація живильних середовищ, одержання рослин регенерантів.

Для забезпечення генетичної стабільності розмножуваних зразків *T. pratense* в якості експлантів використовували пазушні бруньки, пагони та апікальні меристеми, оскільки додаткова меристема більше схильна до спонтанного мутагенезу.

Підготовку ізольованих верхівок до посадки на штучне поживне середовище починали із ізоляції тканин на інтактних рослинах. Меристему вищляли із зелених проростків. Виділення меристеми проводили в ламінарному боксі. Перед початком роботи весь лабораторний посуд, інструменти та руки стерилізували спиртом, інструменти стерилізували також безпосередньо перед виконанням кожної операції, занурюючи в спирт, а потім обпалюючи в полум'ї спиртівки. Експлантати вищляли як з верхівок, так і з бічних бруньок довжиною 1–2 мм, бо вони мають високу регенераційну здатність. Проте, чим більший розмір меристемного експлантату, тобто, чим більше листкових зачатків і тканин стебла він має, тим легше відбуваються процеси морфогенезу, що закінчуються одержанням цілісної пробіркової рослини [1].

Експлантати конюшини садили на середовище, яке містить необхідні компоненти. Необхідними компонентами середовища є цитокиніни і ауксини, які діють вибірково на клітину. Фізіологічну активність в рослинах ауксини проявляють в досить низьких концентраціях 0,1 мг/л. Вони впливають на ризогенез і подальший ріст кореня, викликають інтенсивне видовження клітин в фазі росту розтягом, та контролюють апікальне домінування, диференціацію ксилеми, закладку коренів. Цитокиніни (БАП) стимулюють клітинний поділ, сприяють диференціації бруньок, пригнічують коренеутворення, застошують в концентраціях 0,02 – 0,1 мг/л [4, 6].

Важливим фактором, який відчутно впливає на процеси росту *T. pratense* є освітленість, температура, вологість. Оптимальною для більшості культур є температура 25–27°C. Освітлення може бути цілодобове, або 16 годинне, вологість повітря – 70°C [4, 5]. Для індукції різних типів морфогенезу *in vitro* використовували листкові, стеблові та кореневі експлантати, отримані з асептично вирощених паростків.

Критеріями оптимізації умов мікророзмноження і впливу гормональних і трофічних факторів середовища на морфогенез бобових слугували: частота калусогенезу – кількість експлантатів, на яких утворився калус, частота регенерації – кількість зразків калусу з регенерантами, кількість регенерантів на зразок калусу; частота мікроклонального розмноження – кількість експлантатів з адвентивними пагонами завдовжки 1 см і більше, кількість адвентивних пагонів на один експлантат, частота ризогенезу – кількість укорінених мікроживців, життєздатність вирощених *in vitro* рослин при їх адаптації до септичних умов, та рослин, які вижили на кожному етапі поста-септичного культивування.

За морфолого-анатомічними ознаками проростків *T. pratense* на різних стадіях онтогенезу визначали початок настання фаз розвитку рослин. Вже на 5 добу спостерігали формування листків проростків. На середовищі, яке містило ауксини, стебло формувалось одне розміром, заввишки 1–2 см, тонке, пряме. Спостерігалось формування сім'ядольних листків проростків і закладання перших справжніх

листочків. Листки – великих розмірів в кількості 1–3. На 12–14-у добу стебло сягало 10–11 см, кількість листочків збільшувалася до 9–15. На 21 добу припинявся ріст листочків. Стебло сягало до 15 см (рис. 1).



Рис. 1. *Trifolium pratense* на середовищі Мурасіге-Скуга (НУК)



Рис. 2. *Trifolium pratense* на середовищі Мурасіге-Скуга (БАП)

На середовищі з додаванням цитокинінів, на 7 добу спостерігалось бічне галузнення, формувалось декілька стебел, розміром 1,2–1,5 см, на 14 добу стебло – 5–7 см, кількість листків – 35–40. На 21 добу формувалось 15–18 стебел довжиною 10–13 см, кількість листків – 80 (рис. 2).

У дослідах з одержання культури тканин від вегетативних надземних органів (точки росту, ділянок листкових пластинок і стебел) ми встановили, що всі ділянки надземних органів, виділених з верхньої, середньої та нижньої частини рослин, утворювали диплоїдний первинний калус (табл. 1).

Таблиця 1. Результати мікроклонального розмноження на основі культивування

Формування пагонів із бруньок		Укорінення пагонів	
висаджено бруньок, шт.	сформувалось пагонів, %	висаджено пагонів, шт.	укорінилось, %
60	71,5	45	52,2

При культивуванні стерилізованих проростків на середовищі з БАП в концентрації 1 мг/л, спостерігали утворення калуса з багаточисельними меристематичними ініціалами. Після закладання меристематичних ініціалів, яке спостерігалось через 2–3 тижні після початку культивування відбувалася диференці-

ація пагонів. На поживних середовищах з НУК у концентрації 1,0 мг/л досить часто спостерігали утворен-

ня не морфогенного калюсу, а з калюсною тканини відбувалася диференціація коренів (табл. 2).

Таблиця 2. Вплив регуляторів росту на морфогенез *T. pratense* L.

Регулятор росту	Концентрація в поживному середовищі, мг/л	Результати при культивуванні:		
		стерилізованих проростків	частково диференційованого калюсу	мікроживців
БАП	0,5	–	–	бічне галузнення (95%)
	1,0	80%	–	
	1,5	95%	–	
НУК	0,5	–	коренеутворення (45%)	коренеутворення (45%)
	1,0	утворення не морфогенного калюсу (70%)	регенерація пагонів (90%)	заростання не морфогенним калюсом (95%)
	1,5	коренеутворення (78%)		коренеутворення (30%)

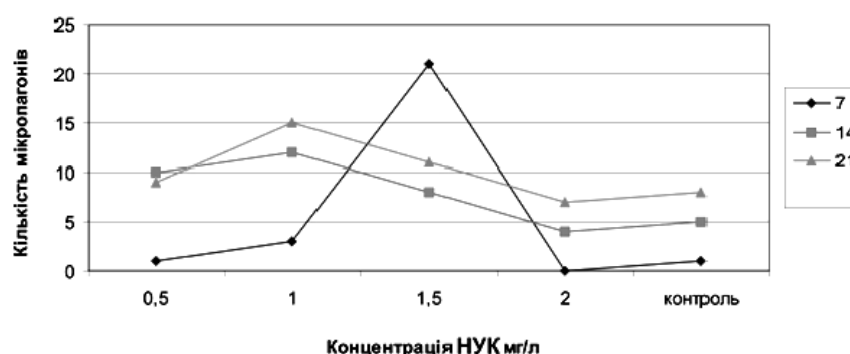


Рис. 3. Вплив концентрації НУК на кількість мікропагонів

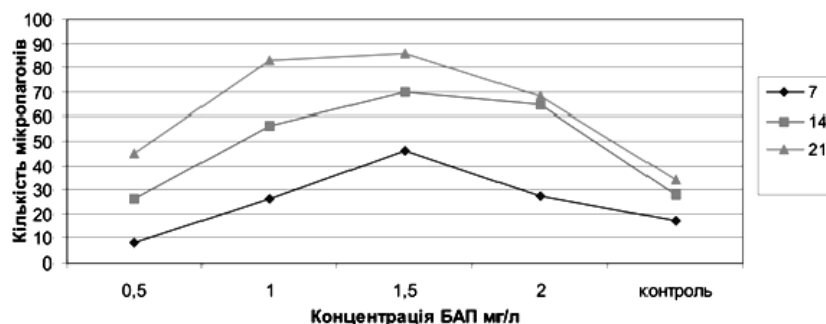


Рис. 4. Вплив концентрації БАП на кількість мікропагонів

В результаті застосування зазначених комбінацій НУК та БАП встановлено що при мікророзмноженні рослин *T. pratense* L. найбільш ефективними були такі концентрації фітогормонів (1–1,5 мг/л). При культивуванні на такому середовищі через 14–21 добу спостерігався активний ріст, як центрального пагона, так і формування додаткових адвентивних пагонів (рис. 3 – 4).

Однією з важливих проблем при мікроклональному розмноженні рослинного матеріалу є коренеутворення. Слід зазначити, що на реалізацію морфогенного потенціалу, в тому числі і коренеутворення, істотно впливає генотип рослинного організму. Згід-

но з літературними даними, у бобових, на органогенезі і ризогенезі генотип впливає сильніше, ніж компоненти культурального середовища [8].

Висновки

Мікроклональне розмноження дає можливість протягом одного місяця одержати велику кількість генетично однорідного посадкового матеріалу.

У досліді із одержання культури тканин від вегетативних наземних органів (точки росту, ділянок листових пластинок і стебел) ми встановили, що всі ділянки наземних органів, виділених з верхньої, середньої та нижньої частини рослин, утворювали диплоїдний первинний калюс.

Частота калусогенезу і частота регенерації пагонів з калусу залежить як від вмісту фітогормонів у середовищах, так і від вихідного експлантата. Експлантати всіх типів здатні до калусогенезу, але стеблові виявились менш ефективними, ніж листові й кореневі.

Оптимальними концентраціями фітогормонів для стимуляції регенерації пагонів з калусу і утворення мікроклонів конюшини виявилися 1,0–1,5 мг/л.

1. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
2. Кушнір Г. П. Регенерація бегонії в культурі *in vitro* // Інтродукція та акліматизація рослин в Україні. – 1982. – Вип. 20. – С. 28–30.
3. Кушнір Г. П. Стан і перспективи клонального мікророзмноження рослин в Україні. Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть, 2001. – Т.1. – С. 484–500.
4. Куртин Н. П., Ніколайчук В. І., Яловська Г. Й. Мікроклональне розмноження господарсько-цінних ліній *Lotus L.* // Укр. Ботан. журн. – 1993. – Т. 50, №3. – С.126–128.
5. Ніколайчук В. І. Лядвенець (*Lotus L.*): біологія, генетика, екологія. – Ужгород, 2002. – 208 с.
6. Ніколайчук В. І., Белчгазі В. Й., Білик П. П. Лабораторний практикум з біотехнології вищих рослин. – Ужгород, 1994. – 40 с.
7. Зінченко Б. С. Багаторічні бобові трави / Б.С. Зінченко – Київ: Урожай, 1970. – 34 с.
8. Tomes D. F. A tissue culture procedure for propagation and maintenance of *Lotus corniculatus* genotypes // *Canad J. Bot.* – 1979. – V. 57, №2. – P. 137–145.

Отримано: 11 червня 2010 р.
Прийнято до друку: 2010 р.