

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН *STYRHNOLOBIUM JAPONICUM* (L.) SCHOTT (*SOPHORA JAPONICA* L.)

У статті обговорено результати наукових досліджень й аналіз експериментальних даних щодо особливостей розмноження *Styphnolobium japonicum* L. в культурі *in vitro*. Наведено результати досліджень з підбору реагентів, їх концентрації та експозиції з метою отримання стерильних експлантів, для подальшого їх культивування. Розглянуто основні етапи мікроклонального розмноження. Показано, що використання модифікованих живильних середовищ приготуваних на базі мікроелементів (у повній і половинній концентрації) живильного середовища за прописом Мурасіге-Скуга надає можливість швидкого отримання запланованої кількості рослин-регенератів. Виконано підбір оптимального середовища для розмноження рослинного матеріалу та підвищення частоти регенерування – частки експлантів, які утворили адвентивні мікропагони та кількості нових мікропагонів на експлант. Найбільш ефективною виявилася обробка, за такою схемою: етанол (3хв.) → HgCl₂ (15хв.), де кількість простерилізованих насінин – 78% і вихід пророслих насінин – 71% від загальної кількості. На середовищі МС-1 розвиток експлантів не відбувається. На середовищах МС-2, МС-3, МС-4, МС-6 здібність експлантів до пробудження бічних бруньок нижча, ніж там де концентрація БАП - 1,5 мг/л. Найбільший коефіцієнт розмноження спостерігали при поєднанні БАП 1,5 мг/л + ІОК 0,5 мг/л. Тривалість пасажу в середньому складала 3-6 тижнів і залежала від темпу розмноження, характеру розвитку експлантата і можливостей експериментатора. В процесі культивування після двох - трьох пасажів спостерігається наростання коефіцієнта розмноження. В шостому пасажі коефіцієнт розмноження досягає своєї максимальної величини. В подальшому (після шести пасажів) спостерігається зменшення здібності експлантів до проліферації. Серед елементів технології мікроклонального розмноження *Styphnolobium japonicum* L. найбільш важливим є дорощування вкорінених пробіркових рослин та їхня адаптація до нестерильних умов *ex vitro*.

Ключові слова: стерилізатор; експланти; експозиція; регулятор росту; живильне середовище; мікропагони.

Вступ. Здатність рослин до відтворення і розмноження є закономірністю еволюційного розвитку рослинного світу та одним з головних його результатів. Негативна діяльність людства й, як наслідок, всезростаюче забруднення навколишнього середовища робить проблему збереження біорізноманіття актуальною та вкрай необхідною для дослідження [5, 7].

¹Курка Світлана Сергіївна, канд. біол. наук, доцент кафедри лісового господарства.

E-mail: svetlana9075@ukr.net; <https://orcid.org/0000-0002-7722-2483>.

Шлапак Володимир Петрович, д-р с.-г. наук, професор, завідувач кафедри лісового господарства.

E-mail: shlapakwp@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8710-5662>.

В останні роки значну увагу приділяють розвитку біотехнології, в основі якої лежить метод клонального мікророзмноження. Цей метод базується на тотипотентності рослинних клітин, їхній де- і диференціації й має значні переваги перед іншими технологіями [1, 6]. Завдяки цьому методу досягається високий коефіцієнт розмноження, внаслідок чого можна отримати велику кількість генетично стабільного та оздоровленого посадкового матеріалу.

Об'єктом дослідження був вид роду *Styphnolobium japonicum* L.

Предмет дослідження – процес підбору режиму стерилізації експлантів *Styphnolobium japonicum* L., оптимального складу середовища та умов культивування для отримання рослин *in vitro*.

Серед значної кількості аборигенних і інтродукованих деревних порід становить вид *Styphnolobium japonicum* L. Тому *метою нашої роботи* було дослідити можливість мікроклонального розмноження *Styphnolobium japonicum* L.; підібрати оптимальні варіанти стерилізації рослинного матеріалу та живильних середовищ; збільшити коефіцієнт розмноження рослин та отримати морфологічно вирівняний матеріал для потреб зеленого будівництва.

Для досягнення зазначеної мети потрібно виконати такі *завдання дослідження*:

- встановити, що краще використовувати у ролі стерилізатора для бруньок та для насіння *Styphnolobium japonicum* L.;
- дослідити найпридатніші живильні середовища для розмноження *Styphnolobium japonicum* L. в умовах *in vitro* і встановити коефіцієнт їх розмноження.

Наукова новизна результатів дослідження полягає в тому, що вперше підібрано оптимальну концентрацію реагенту та тривалість стерилізації експлантів. А також підібрано середовище з оптимальною концентрацією фітогормонів, для подальшого культивування.

Практична значущість отриманих результатів полягає в тому, що у разі введення *Styphnolobium japonicum* L. у культуру *in vitro* як первинні експланти можна використовувати достигле насіння в стані спокою, а бруньки краще не використовувати, оскільки їх заражуваність інфекцією є вищою, а частка життєздатності – нижча.

Упродовж останніх десятиліть розроблено ефективні методи розмноження багатьох видів і форм рослин *in vitro*. Оскільки вид *Styphnolobium japonicum* L. має низьку коренеутворюючу здатність, а інформація щодо розмноження даного виду в культурі *in vitro* відсутня, то розробка методу мікроклонального розмноження цього виду є актуальною.

Матеріали і методи досліджень. У роботі використано методи культури рослинних тканин та індукції морфогенних процесів *in vitro*. Посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища готували за загальноприйнятими методиками. Перед стерилізацією насіння ретельно промивали теплою водою з

милом, через 15 хв. – проточною та ополіскували дистильованою водою. Попередню обробку проводили концентрованою кислотою та окропом з різним терміном дії [10]. Стерилізацію починали із занурення рослинного матеріалу в 70%-й етанол на 3 хвилини. Для стерилізації використовували HgCl_2 з різним терміном дії.

Культивування меристемних ділянок здійснювали на модифікованому середовищі Мурасіге і Скуга (МС) із внесенням до його складу окремих видів фітогормонів різних концентрацій [9]. Вивчаючи вплив фітогормонів на утворення пагонів, використовували БАП (0,5-1,5 мг/л), ІОК (0,5 мг/л), НОК (0,5 мг/л). Пророщування насіння і культивування мікропагонів відбувалося у спеціалізованому приміщенні на скляних стелажах при температурі $25 \pm 1^\circ\text{C}$, відносній вологості 70%, фотоперіоді 16 годин і штучному освітленні інтенсивністю 3-5 тис. люкс. У кожному варіанті було посіяно 25шт. насінин. Повторність досліду – 4-кратна.

Процес клонального мікророзмноження умовно розділяли на чотири етапи: 1) стерилізація рослинного матеріалу та введення у культуру; 2) власне мікророзмноження, коли утворюється максимальна кількість мікропагонів; 3) укорінення розмножених пагонів; 4) перенесення рослин-регенерантів у нестерильні умови адаптації.

Аналіз літературних джерел. Заслужують на увагу роботи присвячені клонуванню різних видів деревних культур. Так, наприклад, для мікророзмноження селекційних сортів каштана апікальні меристеми пагонів ювенільних і дорослих рослин культивували на поживному середовищі Мурасіге–Скуга з БА. Отримані пагони укорінювали на тому ж середовищі з додаванням ІМК (3мг/л), однак збільшення її концентрації до 5 мг/л спричиняло проліферацію калусу [2, 16].

Не менш цікаві дані були отримані при мікророзмноженні берези. Так Л. К. Сімола [14] отримала з тканин листків дорослих рослин спочатку калус, а потім і пагони, які укорінювали в субстраті в умовах теплиць.

Інші дослідники вивчали вплив трьох генотипів, вмісту поживних речовин у середовищі та умов культивування на ріст і забарвлення калусів берези. Виявлено, що ці показники значною мірою залежать від генотипу і дуже мало – від складу середовища. Автори припускають, що різниця у рості калусу пов'язана з ядерним геномом берези, а різниця у забарвленні зумовлена спільною дією ядра та цитоплазми [11, 12].

Калусні культури акації білої було отримано з гіпокотилля, листків і стебла проростків. Пагони утворювались на середовищі М – S з НУК і БА, а корені – на середовищі з ІМК [13].

Узагальнюючи літературні дані, слід зазначити, що основні принципи методу мікророзмноження деревних рослин розроблені. Встановлено, що

калусні і суспензійні культури використовують переважно для листяних порід. При цьому необхідним є цитологічний контроль рослин, що утворились.

Нині ми маємо кілька різних методів мікроклонального розмноження деревних культур. Вони відрізняються лише за станом вихідних клітин та тканин, які використовують для отримання рослин. В одному випадку вихідні тканини перебувають у стані активного клітинного росту, меристемні тканини регенерують калус, проходять первинну диференціацію, інтенсивний органо- і гістогенез, формуються ембріоїди, бруньки, пагони і утворюють рослини [3, 4].

У другому – спершу розпочинається процес диференціації і лише потім поетапно відбуваються процеси, які згадувались вище.

Аналіз літературних даних виявив також відсутність будь-яких відомостей щодо мікроклонального розмноження *Styphnolobium japonicum* L. Тому розробка біотехнології цієї культури є дуже актуальною.

Результати дослідження та їх обговорення. Одним з важливих факторів при введенні у культуру є стерилізація рослинного матеріалу, оскільки всі органи рослин пронизані спорами грибів і бактерій. У деяких рослин мікроорганізми проникають глибоко у тканини і такі рослини важко піддаються стерилізації. Виходячи із вище зазначеного, режим стерилізації підбирали експериментально з дотриманням загальних правил [8, 15] (табл.1).

Таблиця 1

**Ефективність введення в культуру *in vitro* насіння
Styphnolobium japonicum L.**

Термін стерилізації	Кількість			
	стерильних насінин		насінин, що проросли	
	шт.	%	шт.	%
етанол – 3 хв., HgCl ₂ – 5 хв.	3,1	12	2,6	10
етанол – 3 хв., HgCl ₂ - 10 хв.	9,3	37	8,7	35
етанол – 3 хв., HgCl ₂ – 15 хв.	19,6	78	17,8	71
етанол – 3 хв., HgCl ₂ - 20 хв.	20,8	83	6,6	26
етанол – 3 хв., HgCl ₂ - 25 хв.	24,1	96	3,6	14

При обробці насіння HgCl₂ впродовж 5-10 хв. кількість стерильних насінин становить 12 – 25 %, а при збільшенні дії цього чинника до 20-25хв аналогічний показник складає 83 – 96 %, проте схожість насіння різко знижується. На нашу думку це пов'язано з тим, що після обробки насіння сірчаною кислотою оболонка була ушкоджена і стерилізатор знищив зародок.

Найбільш ефективною виявилася обробка за такою схемою: етанол (3хв.) → HgCl₂ (15хв.), де кількість простерилізованих насінин - 78% і вихід пророслих насінин - 71% від загальної кількості.

Пророщування насіння (рис. 1.) проводили на модифікованому живильному середовищі Мурасіге – Скуга (МС) [9].

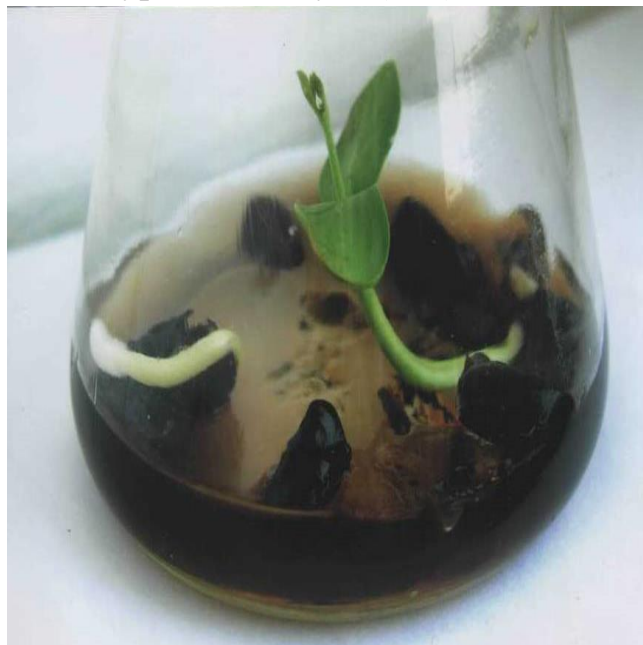


Рис. 1. Пророщування насіння *Styphnolobium japonicum* L. на модифікованому живильному середовищі Мурасіге–Скуга

Через 25-30 днів після посіву у пророщеного насіння відділяли апікальну меристему від кореня і переносили на свіже середовище. Культивування експлантів відбувалось на вище вказаному середовищі з різним вмістом регуляторів росту (табл. 2).

На середовищі МС-1 розвиток експлантів не відбувається. На середовищах МС-2, МС-3, МС-4, МС-6 здібність експлантів до пробудження бічних бруньок нижча, ніж там, де концентрація БАП - 1,5 мг/л. Найбільший коефіцієнт розмноження спостерігали при поєднанні БАП 1,5 мг/л + ІОК 0,5 мг/л. В процесі клонального мікророзмноження конгломерати бруньок та пагонів, що сформувалися, вимагали періодичного розділення їх на окремі одиниці (рис. 2.).

Пагони-регенеранти, що досягали довжини 1-1,5см відокремлювали від материнської рослини і пересаджували на живильне середовище з різним вмістом ауксинів для індукції ризогенезу.

Під час експерименту встановлено, що рослини, які досягли довжини 3–5 см та мали 3–4 справжніх листки, перед укоріненням необхідно пересаджувати на живильне середовище з ІМК (1 мг/л) та сахарозою (20 мг/л) і вирощували на ньому 15 діб з подальшим переселенням пагонів на середовище без гормонів.

Вплив середовищ з різним вмістом регуляторів росту на коефіцієнт розмноження *Styphnolobium japonicum* L.

Середовище	Цитокініни, мг/л	Ауксини, мг/л		Коефіцієнт розмноження (після третього пасажу)
	БАП	ІОК	НОК	
МС -1	0,5	--	--	---
МС-2	0,5	0,5	--	2,6
МС-3	0,5	--	0,5	1,1
МС-4	1,0	--	--	1,8
МС -5	1,0	0,5	--	3,7
МС-6	1,0	--	0,5	2,2
МС-7	1,5	--	--	3,4
МС-8	1,5	0,5	--	6,4
МС-9	1,5	--	0,5	4,1

Через 40-45 діб у результаті диференціювання клітин і тканин, спостерігали масовий прояв одного з типів морфогенезу – ризогенезу. Упродовж 60 – 68 діб було одержано понад 90 % регенерантів, що мали корені.



Рис. 2. Сіянець *Styphnolobium japonicum* L. на модифікованому живильному середовищі Мурасіге – Скуга

Тривалість пасажу в середньому складала 3-6 тижнів і залежала від темпу розмноження, характеру розвитку експлантата і можливостей експериментатора. В процесі культивування після двох - трьох пасажів спостерігається наростання коефіцієнта розмноження. В шостому пасажі коефіцієнт розмноження досягає своєї максимальної величини. В подальшому (після шести пасажів) спостерігається зменшення здібності експлантатів до проліферації.

Найскладнішим етапом у процесі мікророзмноження є адаптація рослин до природніх умов зростання. На цьому етапі загибель висаджених рослин іноді досягає 80–100%. Це пов'язано, на нашу думку, з аномальним розвитком

кореневої системи під впливом ауксину, порушенням водного обміну у рослин-регенерантів, зумовленим підвищеною транспірацією та зниженою здатністю до фотосинтезу пересаджених з пробірок укоріненних рослин.

Значне підвищення рівня виживання рослин при введенні додаткової стадії пов'язано, на нашу думку, з тим, що спочатку відбувається перебудова характеру живлення рослин-регенерантів у бік збільшення їхньої автотрофності (в субстраті відсутні екзогенні вуглеводи, вітаміни), а потім рослини пристосовуються до природних умов існування. Введення двоступеневої адаптації забезпечило виживання і ріст 70–80 % рослин у нестерильних умовах.

Висновки. Для руйнування твердої оболонки та для підвищення схожості насіння *Styphnolobium japonicum* L. необхідно проводити попередню обробку концентрованою сірчаною кислотою впродовж 15 хв.

При введенні в культуру насіння *Styphnolobium japonicum* L. найбільш ефективно виявилось оброблення, за такою схемою: етанол (3 хв.)→HgCl₂ (15 хв.).

Найбільший коефіцієнт розмноження спостерігали при поєднанні БАП 1,5мг/л+ІОК 0,5мг/л.

References

1. Adamenko, S. A. (2013). Podbor pitatelnoi sredy dlia razmnozheniia Pinus nigra Arn. v usloviakh in vitro. Estestvenno-gumanitarnye issledovaniia: mezhdunarodnyi zhurnal, 2, 17–21.
2. Biotekhnologiiia. (1989). Biotekhnologiiia rastenii: kultura kletok. (V. I. Negruka Trans. from English, R. G. Butenko with a Foreword). Moscow: Agropromizdat, 280 [In Russian].
3. Boxus Ph., Druart P. (1986) Biotechnology in agriculture and forestry. — Berlin: Springer Verlag, — 60 [in England].
4. Diego, N. De, Montalbán, I. A., & Moncaleán, P. (2010). In vitro regeneration of adult Pinus sylvestris L. Trees South African Journal of Botany, 76, 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.09.007>
5. Kurka, S. S. (2018). Sposoby usunennia tverdonasinnosti u vydiv Sofora japonica L. Perspektyvy rozvytku lisovoho ta sadovo-parkovoho hospodarstva, 3, 231 – 233.
6. Kurka S.S. (2019) Osoblyvosti vyroschuvannja Sophora japonica L. u sadovo-parkovyh gospodarstvah // Naukovyj visnyk NLTU Ukrainy 29 (7), 45-49. DOI: <https://doi.org/10.15421/40290710>
7. Kurka S.S., Shlapak V.P., Adamenko S.A., & Ischuk G.P. (2020) Harakterystyka plodiv i nasinnja roslyn Styphnolobium japonicum (L.) Schott (Sophora japonica L.) ta sposoby usunennja jih tverdonasinnosti v umovah Pravoberezhnogo Lisostepu i Stepu Ukrainy. Naukovyj visnyk NLTU Ukrainy: zbirnyk naukovo-tehnychnykh prac'. – L'viv: RVV NLTU 30 (4), 9-13. DOI: <https://doi.org/10.36930/40300401>
8. Kalynyn F.L., Sarnackaja V.V., Polyschuk V.E. (1980) Metody kul'tury tkanej v fyzyologyy u byohymy rastenyj. — Kyiv: Naukova Dumka [In Ukrainian].
9. Kushnir G. P. (1982) Regeneracija begoniji v kul'turi in vitro // Introdukcija ta aklimatyzacija roslyn v Ukraini. — Vyp. 20, 28–30 [In Ukrainian].
10. Kushnir G. P. (2001) Stan i perspektyvy klonal'nogo mikrorozmnozhennja roslyn v Ukraini. Genetyka i selekcija v Ukraini na mezhi tysjacholit', – T.1., 484–500 [In Ukrainian].
11. Lapin, P. I., Kalutckii, K. K., & Kalutckaia, P. I (1979). Introdukciia lesnykh porod. Moscow:

Lesn. prom-st, 224 [In Russian].

12. Lypa, A. L. (1978). Introdukciia i akklimatizatsiia drevesnykh rastenii na Ukraine. Kiev: Vyshha shkola, 112 [In Russian].

13. Meyer H.I., Van Staven I. (1987) Acacia melanoxyton in vitro. Regeneration of Acacia melanoxyton plantlets in vitro // S. Afr. J. Bot. 53, No 3., 206-209 [in England].

14. Symola L.K. (1986) Kaljusnye kul'tury y razmnozhenye berezy in vitro // Kul'tura kletok rastenyj y botehnologyja. – M., 102–106 [In Russian].

15. Vietez Ana M., Ballester A., Vietez M. (1983) In vitro plantlet generation of mature chesnut // J. Hortic Sci. 58, No 4. 457–463 [in England].

16. Yakovlev, G. P., Sytin, A.K., & Roskov Y.R. (Ed.), (1996). Legumes of Northern Eurasia. Kew: Royal Botanic Gardens, 724 p [in England].

S. S. Kurka¹, V. P. Shlapak¹

Uman National University of Horticulture, Uman, Ukraine

MICROCLONAL REPRODUCTION OF STYPHNOLOBIUM JAPONICUM(L.) SCHOTT (SOPHORA JAPONICA L.) PLANTS

The article discusses the results of scientific research and the analysis of experimental data regarding the characteristics of reproduction of Styphnolobium japonicum L. in in vitro culture. The results of research on the selection of reagents, their concentration and exposure in order to obtain sterile explants for their further cultivation are presented. The main stages of microclonal reproduction are considered. It is shown that the use of modified nutrient media prepared on the basis of microelements (in full and half concentration) of the nutrient medium according to the Murashige and Skoog's recipe provides the possibility of quickly obtaining the planned number of regenerated plants. The selection of the optimal environment for the propagation of plant material and increasing the frequency of regeneration was carried out - the proportion of explants that formed adventitious microshoots and the number of new microshoots per explant. The most effective treatment was the following scheme: ethanol (3 min.) → HgCl₂ (15 min.), where the number of sterilized seeds was 78% and the yield of germinated seeds was 71% of the total number. Explants do not develop on MC-1 medium. On media MC-2, MC-3, MC-4, MC-6, the ability of explants to awaken lateral buds is lower than where the BAP concentration is 1.5 mg/l. The highest multiplication factor was observed with the combination of BAP 1.5 mg/l + IOK 0.5 mg/l. The duration of the passage was 3-6 weeks on average and depended on the rate of reproduction, the nature of the explant development and the capabilities of the experimenter. In the process of cultivation, after two to three passages, an increase in the reproduction coefficient is observed. In the sixth passage, the multiplication factor reaches its maximum value. In the future (after six passages), there is a decrease in the ability of explants to proliferate. Among the elements of the technology of microclonal reproduction of Styphnolobium japonicum L., the most important is the growing of rooted tube plants and their adaptation to non-sterile ex vitro conditions.

Key words: *sterilizer; explants; exposition; growth regulator; nutrient medium; micro shoots.*