

10. Yilmaz A. The Effects of Cobalt-60 Applications on Yield and Yield Components of Cotton (*Gossipium barbadense* L.). A. Yilmaz, B. Erkan : Pakistan J. of Biol. Sci. – 2006. – № 15. – P. 2761–2769.

УДК 60:57.085.2:582.717.4

ДІЯ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА РЕГЕНЕРАЦІЙНУ ЗДАТНІСТЬ ТКАНИН РОСЛИН *HYDRANGEA MACROPHYLLA* L. В УМОВАХ *IN VITRO*

Нестерова Н.Г. – к.с.-г.н., асистент, НУБіП України
Чорнобров О.Ю. – к.с.-г.н., науковий співробітник,
ВП НУБіП України «Боярська лісова дослідна станція»

У статті досліджено дію регуляторів росту цитокінінового та ауксинового типів дії на регенераційну здатність тканин рослин *Hydrangea macrophylla* L. в умовах *in vitro*. Підбрано компоненти живильного середовища на етапах власне мікроклонального розмноження та укорінення мікропагонів *in vitro*. Розроблено біотехнологію мікроклонального розмноження рослин *H. macrophylla*, використання якої дозволяє отримувати значну кількість рослин-регенерантів у стислі терміни.

Ключові слова: *Hydrangea macrophylla* L., культура *in vitro*, експлантати, регенераційна здатність, регулятори росту, живильне середовище, мікроклональне розмноження.

Нестерова Н.Г., Чорнобров О.Ю. Действие регуляторов роста на регенерационную способность тканей растений *Hydrangea macrophylla* L. в условиях *in vitro*

В статье исследовано действие регуляторов роста цитокининового и ауксинового типов воздействия на регенерационную способность тканей растений *Hydrangea macrophylla* L. в условиях *in vitro*. Подобрано компоненты питательной среды на этапах собственно микроклонального размножения и укоренения микропобегов *in vitro*. Разработана биотехнология микроклонального размножения растений *H. macrophylla*, использование которой позволяет получать значительное количество растений-регенерантов в сжатые сроки.

Ключевые слова: *Hydrangea macrophylla* L., культура *in vitro*, эксплантаты, регенерационная способность, регуляторы роста, питательная среда, микроклональное размножение.

Nesterova N.G., Chornobrov O.Yu. Growth regulator effect on the regenerative ability of plant tissues of *Hydrangea macrophylla* L. in *in vitro* conditions

The article explores the effect of growth regulators of cytokinin and auxin types of action on the regenerative ability of plant tissues of *Hydrangea macrophylla* L. in *in vitro* conditions. It specifies the components of the nutrient medium at the stages of actual microclonal propagation and rooting of microshoots *in vitro*. The study develops the biotechnology of microclonal propagation of plants *H. macrophylla*, using of which allows obtaining a significant number of plant regenerants within a limited period.

Keywords: *Hydrangea macrophylla* L., *in vitro* culture, explants, regenerative capacity, growth regulators, nutrient medium, microclonal propagation.

Постановка проблеми. Гортензія великолиста (*Hydrangea macrophylla* L.) – цінний представник родини Гортензієві (*Hydrangeaceae* Dumort.), розміри суцвіть якого суттєво перевершують дикорослі рослини. У якості декоративної рос-

лини широко використовується для оформлення міських парків, скверів, алей тощо [1, с. 125-144].

Однак, незважаючи на широку популярність досліджуваної рослини, ефективна технологія масового отримання садивного матеріалу фактично відсутня, оскільки розмноження відсадками є малоефективним, внаслідок низького коефіцієнту укорінення; а насінням – складним та трудомістким через незначні його розміри (до 1 мм) [2, с. 70]. Крім того, вегетативне розмноження зумовлює поширення вірусних та бактеріальних захворювань, що значно обмежує його використання [3, с. 105-107]. Тому застосування такого альтернативного методу розмноження як мікроклональне, є особливо актуальним [3, с. 159-201; 4, с. 301-412]. Для окремих генотипів декоративно-квітучих кущів технології мікроклонального розмноження розроблені достатньо добре і активно використовуються для отримання рослин-регенерантів [4, с. 500]. Водночас, дослідження зарубіжних авторів відносно техніки отримання рослин *H. macrophylla* у культурі *in vitro* є фрагментарними [5, с. 304-307; 6, с. 450-520; 7, с. 166; 8, с. 526], а на території України інформація про подібні дослідження – відсутня. У нашій попередній публікації було зазначено методику введення експлантатів рослин *H. macrophylla* у культуру *in vitro* [9, с. 66].

Мета роботи – дослідження регенераційної здатності тканин рослин *H. macrophylla in vitro* за дії регуляторів росту для масового мікроклонального розмноження з подальшим адаптуванням до умов відкритого ґрунту.

Матеріали і методи дослідження. Ефективна стерилізація (понад 80 %) експлантатів, ізольованих із 5-ти річних рослин-донорів *H. macrophylla* (форма суцвіття – махрова біла) у фенофазі розгортання листків досягалася шляхом витримування у 0,1 % розчині HgCl_2 упродовж 10 хв. Експлантати, ізольовані у фенофазі цвітіння доцільно витримувати упродовж 5 хв у 1 % AgNO_3 з наступним перенесенням у 2,5 % NaClO . Регенераційна здатність експлантатів, ізольованих із рослин-донорів у фенофазі розгортання листків, достовірно вища, ніж у фенофазі цвітіння [9, с. 67]. Введення експлантатів у культуру *in vitro* проводили на безгормональному живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [10, с. 115]. Регенераційну здатність тканин рослин визначали на живильному середовищі МС за дії регуляторів росту цитокінінового ($0,25 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ кінетину, $0,1 - 3,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП, $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ 2-іп) та ауксинового ($1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІОК, $0,5 - 2,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІМК) типів дії. Показник кислотності середовища (рН) доводили до рівня 5,8–5,9. Рослинний матеріал культивували за загальноприйнятою методикою [11, с. 105; 12, с. 201-217]. Морфометричні показники мікропагонів фіксували на 60 – 65 добу культивування. Статистичне опрацювання експериментальних даних виконували з використанням пакету аналізу *MS Excel*. У таблиці наведено середні арифметичні значення та їх стандартні похибки.

Результати дослідження. Функціонування коливального процесу диференціації і морфогенезу в культурі ізольованих тканин і органів рослин відбувається шляхом внесення екзогенних регуляторів росту – ауксинів, цитокінінів та гіберелінів [6, с. 138-140; 8, с. 525]. У наших дослідженнях використовували регулятори росту цитокінінового (БАП і кінетин, 2-іп) та ауксинового типів дії, і визначали їх дію на ріст та розвиток мікропагонів *H. macrophylla* (табл 1).

Таблиця 1 - Дія регуляторів росту на морфометричні показники мікропагонів рослин *H. macrophylla in vitro* (МС, 60–65 діб у культурі)

Варіант	Склад живильного середовища МС	Довжина мікропагона, см	Коефіцієнт розмноження	Інтенсивність регенерації кореневої системи ²	Пігментація мікропагона	Тип мікроклонального розмноження
К ¹	безгормональне	4,2±0,3	4±1	активна	зелена	а. р. м. е. ³
1	½ концентрації макросолей за МС, 50 мг·л ⁻¹ інозитулу й 15 г·л ⁻¹ глюкози, 1,0 мг·л ⁻¹ ІОК й 0,1 мг·л ⁻¹ БАП	5,5±0,6	5±1	-/-	-/-	-/-
2	2,0 мг·л ⁻¹ ІМК	4,6±0,2	4±1	середня	-/-	-/-
3	0,25 мг·л ⁻¹ кінетину	4,5±0,5	7±2	активна	-/-	-/-
4	0,25 мг·л ⁻¹ кінетину й 0,5 мг·л ⁻¹ ІМК	1,7±0,3	2±1	низька	світло-зелена	-/-
5	0,5 мг·л ⁻¹ БАП	3,6±0,4	5±2	-/-	-/-	-/-
6	0,5 мг·л ⁻¹ БАП й кінетину	2,0±0,2	7±2	-/-	зелена	п.м. ⁴
7	1,0 мг·л ⁻¹ БАП й 20 мг·л ⁻¹ аденіну	1,9±0,2	2±1	-/-	-/-	а. р. м. е. ³
8	3,0 мг·л ⁻¹ БАП й 20 мг·л ⁻¹ аденіну	1,1±0,2	2±1	низька	світло-зелена	-/-
9	1,0 мг·л ⁻¹ 2-ір й 20 мг·л ⁻¹ аденіну	2,1±0,4	2±1	активна	зелена	-/-

Примітки: 1. Контроль; 2. Інтенсивність регенерації кореневої системи: активна – більше, ніж 3 см; середня – 1,0–2,9 см; низька – менше, ніж 0,9 см; 3. Активація росту меристем експлантату (а. р. м. е.); 4. Прямий морфогенез (п. м.).

Рослини *H. macrophylla* були мікроклонально розмножені за використання різних типів індукованого морфогенезу *in vitro*: активації росту меристем експлантата й прямого морфогенезу. В усіх варіантах живильних середовищ (включно і контроль), окрім 6 варіанту (0,5 мг·л⁻¹ БАП й кінетину) регенерація мікропагонів рослин *H. macrophylla in vitro* відбувалася шляхом активації росту наявних меристем експлантатів. Використання двох цитокінінів (БАП і кінетину, варіант 6) викликало значне закладання адвентивних бруньок у тканинах експлантатів. Усі варіанти досліджуваних живильних середовищ індукували ризогенез у мікропагонів, однак із різною інтенсивністю. Найактивніше коренеутворення фіксували у варіантах 1, 3, 9 та контроль, де одночасно відбувалася регенерація як кореневої системи, так і мікропагона. Суттєві результати з регенерації мікропагонів було одержано на живильному середовищі з ½ концентрації макросолей за МС, 50 мг·л⁻¹ інозитулу й 15 г·л⁻¹ глюкози, 1,0 мг·л⁻¹ ІОК й 0,1 мг·л⁻¹ БАП (варіант 1, рис. 1, в); 2,0 мг·л⁻¹ ІМК (варіант 2); 0,5 мг·л⁻¹ БАП (варіант 5).

Наукоємний практичний результат із мікроклонального розмноження рослин нами було досягнуто на середовищі з 0,25 мг·л⁻¹ кінетину (варіант 3), що дозволяє одержувати мікропагони зі значним коефіцієнтом розмноження (7±2) й характерною пігментацією та активною регенерацією кореневої системи (рис. 1, б, г). Таким чином, у результаті проведених досліджень нами визначено регенераційну здатність тканин рослин *H. macrophylla in vitro* за дії регуляторів росту та розроблено біотехнологію мікроклонального розмноження.

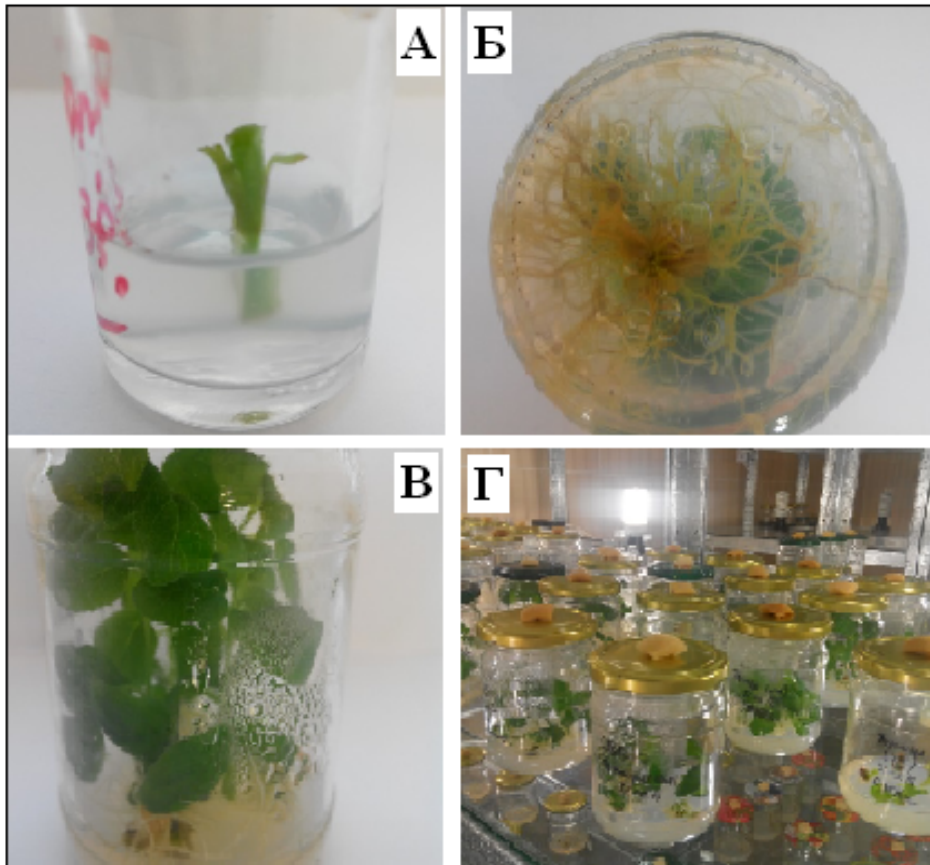


Рисунок 1 – Результат дії регуляторів росту на регенераційну здатність тканин рослин *H. macrophylla* у культурі *in vitro*: а) життєздатні експлантати на безгормональному МС; б) загальний вигляд кореневої системи рослин на МС з $0,25 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ кінетину, 60-та доба культивування; в) рослини-регенеранти на $\frac{1}{2}$ концентрації макросолею за МС, з інозитолом, глюкозою й $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ІОК й $0,1 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП; г) масове клонування рослин-регенерантів у культуральному приміщенні.

Висновки. 1. Розроблено біотехнологію мікроклонального розмноження рослин *H. macrophylla*, яка включає різні типи індукованого морфогенезу *in vitro* (активація росту наявних меристем експлантата та прямий морфогенез) та дозволяє одержувати значну кількість рослин-регенерантів.

2. Досліджено дію регуляторів росту ауксинового та цитокінінового типів дії на регенераційну здатність тканин рослин *H. macrophylla in vitro*.

3. Установлено, що найоптимальнішими умовами для індукції прямого морфогенезу в тканинах мікропагонів *H. macrophylla in vitro* є використання живильного середовища МС з додаванням $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ БАП й кінетину, яке дозволяє упродовж 60 – 65 діб отримувати мікропагони (коефіцієнт розмноження – 7 ± 2).

4. Для мікроклонального розмноження шляхом активації росту наявних меристем експлантата та активного розвитку кореневої системи, мікропагони

H. macrophylla доцільно культивувати на живильному середовищі МС з внесенням $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину.

5. Підібрано оптимальний склад живильного середовища та цикл культивування для мікроклонального розмноження, укорінення та одержання рослин-регенерантів *H. macrophylla* з подальшим адаптуванням до умов відкритого ґрунту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Колесников А.И. Декоративная дендрология [Издание второе, испр. и доп.] / А.И. Колесников – М.: Лесн. пром, 1974. – 704 с.
2. Hill L. *Hydrangea* / L. Hill, N. Hill // Country Journal, 1995. – V. 7 (8) – P. 70–71.
3. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин: теорія і практика [монографія] / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К.: Наук. думка, 2005. – 269 с.
4. Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин [підручник для студ. агробіол. та біол. спец., наук., викл., асп.] / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах – К.: Поліграфконсалтинг, 2003. – 520 с.
5. Sebastian T.K. *In vitro* propagation of *Hydrangea quercifolia* Bartr / T.K. Sebastian, C.W. Heurser // Scientia Hort., 1987. – V. 31. – P. 303–309.
6. Preece E.P. The influence of Thidiazuron on *in vitro* shoot proliferation of Oak leaf *Hydrangea* (*Hydrangea quercifolia* Bartr.) / E.P. Preece, D.I. Ledbetter // Acta Hort., 2003. – V. 2. – P. 625.
7. Dahab Abou T.A.M. *In vitro* propagation of *Hydrangea macrophylla* Thunb / T.A.M. Dahab Abou // Arab J. Biotech., 2007. – V. 10. – №1. – 161–178.
8. Douglas A.B. *In vitro* propagation of Florists *Hydrangea* / A.B. Douglas, G.R. Seckinger, P.A. Hammer // HortScience, 1986. – V. 21. – №3. – P. 525–526.
9. Нестерова Н.Г. Регенераційна здатність експлантатів рослин *Hydrangea macrophylla* L. в умовах *in vitro* / Н.Г. Нестерова, О.Ю. Чорнобров // Біотехнологія: звершення та надії: IV всеукр. наук.-практ. конф. студ., асп. та мол. вчених, 21-22 травня 2015 року: тези доповідей. – Київ, 2015. – С. 66–67.
10. Murashige T. A revised medium for rapid, growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // Physiol. plantarum, 1962. – V.15. – №3. – P. 473.
11. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений [Учеб. пособ.] / Р.Г. Бутенко – М.: Наука, 1964. – 272 с.
12. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.