

УДК 631.527:577.2:634.21:634.23

ПОЛІЩУК В.В., д-р с.-г. наук

ЩЕРБА І.В., аспірант

Уманський національний університет садівництва

**СТЕРИЛІЗАЦІЯ СОМАТИЧНИХ БРУНЬОК  
ВИХІДНИХ ФОРМ САКУРИ *PRUNUS SERRULATA* L.  
ДЛЯ ВВЕДЕННЯ *IN VITRO***

Наведено результати досліджень з оптимізації техніки підготовки соматичних бруньок вихідних форм сакури (*Prunus serrulata* L.) для введення *in vitro*, а також підбору стерилізатора, його концентрації, експозиції обробки та інших параметрів проведення ефективної стерилізації. Встановлено особливості застосування загальноживаних і нових стерилізаторів та підбрано оптимальні режими для ефективної стерилізації соматичних бруньок вихідних форм сакури (*Prunus serrulata* L.).

Доведено, що найефективнішим стерилізатором соматичних бруньок вихідних форм сакури (*Prunus serrulata* L.) є 15 % розчин хлораміну за експозиції 15 хвилин – 90 % стерильного матеріалу.

**Ключові слова:** вихідний матеріал, сакура, селекція, експлант, стерилізація, *in vitro*, вишня, біотехнологія, інтродукція, квітнування, класифікація, морфологічні ознаки.

**Постановка проблеми.** Методи культури ізольованих верхівкових меристем успішно використовуються як для оздоровлення рослинного матеріалу від вірусної і грибкової інфекцій та нематод, так і для прискореного розмноження цінних генотипів [1].

Технології прискореного розмноження ґрунтуються на тому, що хімічні сполуки групи цитокінінів здатні знімати апікальне домінування і стимулювати закладання й швидкий розвиток бічних пагонів. Мікроклонування *in vitro* дає змогу отримувати в пробірках з живильним розчином велику кількість рослин-регенерантів. Однак кількість загинувших пробіркових рослин після перенесення їх у нестерильні умови залишається для багатьох культур досить великою [2]. В основі методу лежить унікальна здатність рослинної клітини реалізовувати властиву їй тотипотентність. Згідно із науковою термінологією клонування передбачає одержання генетично ідентичних організмів з цілісного організму. Цей метод має низку переваг над існуючими традиційними способами розмноження:

- одержання генетично однорідного садивного матеріалу;
- звільнення рослин від вірусів за рахунок використання меристемної культури;
- високий коефіцієнт розмноження (105–106 – для трав'янистих, квіткових рослин, 104–105 – для кущових та деревних рослин і 104 – для хвойних);
- скорочення тривалості селекційного процесу;
- пришвидшення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;
- розмноження рослин, які важко розмножуються традиційними способами;
- можливість проведення робіт протягом всього року;
- можливість автоматизації процесу вирощування [3].

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Зазвичай, вчені як первинний експлантат використовують верхівкові меристеми трав'янистих рослин: гвоздики, хризантеми, соняшнику, гороху, кукурудзи і т.д. У колишньому Радянському Союзі роботи з клонального мікророзмноження було розпочато в 30-х роках. Під керівництвом Р.Г. Бутенко було вивчено мікророзмноження картоплі, буряку цукрового, гвоздики, гербери та інших рослин і запропоновано промислові технології. В подальшому дослідження з клонального мікророзмноження охопили і деревні рослини [1].

Однак, перші роботи з культури тканин деревних рослин було опубліковано в середині 20-х років ХХ століття, стосовно камбіальних тканин деяких рослин, що здатні до калусогенезу *in vitro*. Відомо, що деревні, і особливо хвойні рослини

характеризуються повільним ростом, складно вкорінюються, містять велику кількість вторинних сполук (феноли, терпени і т.д.), які в ізольованих тканинах активуються. Окислені феноли зазвичай інгібують поділ і ріст клітин, що призводить до загибелі первинного експланту або зменшення здатності тканин деревних рослин до регенерації адвентивних бруньок, яка з віком рослини-донора зникає практично повністю. Нині, не зважаючи на складності, нараховується більше 200 видів деревних рослин із 40 родин, які були розмножені *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, сосна, ялина, секвоя та ін.) [3].

Протягом останніх десятиріч методи біотехнології знаходять все більше застосування в селекції рослин [1–6, 10, 11]. Прискорене розмноження дефіцитних генотипів *in vitro* має сенс лише тоді, коли в процесі мікроклонування спадковість розмножуваної особини залишається недоторканою [5]. Розмноження *in vitro* найбільш вдало поєднує переваги щодо збереження спадковості певних ознак розмножуваних генотипів, зокрема чоловічу стерильність та інші господарчо цінні ознаки, з підвищеними коефіцієнтами розмноження.

У культуру *in vitro* можуть бути введені експланти, заготовлені з різних частин рослини (коренів, пагонів, листків, апікальних меристем тощо), однак кращі результати дає стартовий матеріал зі швидкими темпами росту і розвитку [5, 11]. Процес мікроклонального розмноження, незалежно від типу експлантів, можна умовно розділити на чотири головні етапи: стерилізація рослинного матеріалу і введення експлантів на живильне середовище; проліферація (швидке розмноження); гемо- і ризогенез (індукування розвитку мікропагонів і коренів) та адаптація до нестерильних умов *ex vitro* [11].

Сакура (або вишня дрібнопильчата – *Prunus serrulata* L.) є символом Японії. Цей різновид вишні належить до родини Розових (*Rosaceae* L.). Квітування сакури триває лише сім днів, однак навіть за цей невеличкий проміжок часу японці встигають провести так звані ханами – свята милування квітами [12].

Квітує білими і рожевими квітами в кінці березня, до того як розпускається листя. Період квітування короткий. Найстійкіші квіти тримаються всього тиждень. Потім рослина нічим себе не виділяє. Однак саме в цей тиждень, коли квітує сакура людину переповнюють почуття прекрасного і світлого [12] (рис. 1).

Стерилізація належить до найважливіших компонентів технології розмноження *in vitro*. На поверхні вегетуючої рослини і її частин, листків, бруньок, проростків та інших джерел експлантів, знаходиться велика кількість різноманітних мікроорганізмів.



Рис. 1. Квітування сакури *Prunus serrulata* L.

Ці мікроорганізми здатні рости і розмножуватись на живильному середовищі. У процесі свого росту й розвитку гриби і бактерії не тільки поглинають поживні речовини живильного середовища, а також гальмують ростові процеси в експлантах і в наступному, якщо рослина не загинула, всі біологічні процеси рослини. Тому від якості стерилізації залежить успіх подальшого культивування [1, 4, 11].

У процесі вибору технології стерилізації і власне стерилізатора біотехнолог намагається звільнити поверхню рослинного матеріалу від будь-яких мікроорганізмів, мінімізуючи небезпеку пошкодження експлантів стерилізатором, до складу кожного з яких входять досить токсичні речовини [4, 5, 11].

**Метою досліджень** було підбір умов стерилізації, як одного з найбільш відповідальних етапів мікроклонального розмноження, та поставлено завдання з'ясувати особливості застосування загальноживаних і нових стерилізаторів та підібрати оптимальні режими для ефективно стерилізації соматичних бруньок вихідних форм сакури (*Prunus serrulata* L.).

**Методика досліджень.** За експланти використовували соматичні бруньки, які в ламінар-боксі зрізали пропареним за 180–200 °С скальпелем і негайно переносили простерилізованим (разом зі скальпелем) пінцетом на живильне середовище, приготовлене за прописом Мурасіге і Скуга [5], яке було модифіковане нами 6-бензиламінопурином (6-БАП) – 1 мг/л. Як стерилізатори використовували хлорамін, дихлорид ртуті (сулему) та септодор-форте з різною концентрацією робочого розчину. Перед стерилізацією експлантів (*Prunus serrulata* L.) проводили промивання рослинного матеріалу милом і стерильною водою 15–20 хвилин, щоб з їхньої поверхні змити зовнішні грибково-бактеріальні інфекції.

Кількість висадженого матеріалу становила 50 штук для всіх видів стерилізації. Решту маніпуляцій з рослинним матеріалом виконували за загальноживаними методиками [1–5, 10].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Дослідженнями встановлено, що за експозиції стерилізації до однієї хвилини вихід стерильних живців не перевищував нуля (табл. 1).

У разі збільшення експозиції від однієї до десяти хвилин майже на одному рівні були стерилізатори дихлорид ртуті 0,05 % і септодор-форте, вихід стерильних–життєздатних експлантів становив близько 50–58 %, а стерилізація рослинного матеріалу хлораміном з концентрацією 10 % давала найменший вихід живців — від 14 до 20 % (рис. 2).



Рис. 2. Розвиток рослин регенерантів сакури *Prunus serrulata* L.

Таблиця 1 – Ефективність стерилізації рослинного матеріалу (*Prunus serrulata* L.) залежно від типу стерилізатора і експозиції, (2014–2015 рр.)

Стерилізатор	Концентрація стерилізатора, %	Експозиція стерилізації, хв	Кількість неінфікованого матеріалу, %	Некроз експланта, %
Хлорамін	5	10	30	–
		15	44	–
		20	26	24
Хлорамін	10	10	14	–
		15	18	–
		20	20	26
Хлорамін	15	10	78	–
		15	90	–
		20	50	–
Дихлорид ртуті (сулема)	0,01	10	12	–
		15	19	–
		20	13	7
Дихлорид ртуті (сулема)	0,05	10	58	–
		15	56	4
		20	4	9
Дихлорид ртуті (сулема)	0,1	10	54	–
		15	46	2
		20	52	4
Септодор-форте	5	10	49	–
		15	58	4
		20	36	8

Найефективнішою стерилізуючою речовиною для введення соматичних бруньок в ізолювану культуру визначено 15 % розчин хлораміну за експозиції 15 хвилин. Вихід стерильних–життєздатних експлантів у цьому варіанті досліду в середньому складає 90 %.

Також відмічено, що за збільшення експозиції до 20 хвилин, як і у варіанті з сулемою з концентрацією 0,01 %, тканини рослин не витримували навантаження і гинули (рис. 3).



Рис. 3. Некроз експланта *Prunus serrulata* L.

Некроз експланта виявлено в усіх варіантах досліджень, однак найбільшу кількість загиблих живців встановлено для стерилізатора хлорамін 5–10 % за експозиції 20 хвилин.

**Висновки.** У результаті досліджень доведено, що найефективнішим стерилізатором соматичних бруньок вихідних форм сакури (*Prunus serrulata* L.) є 15 % розчин хлораміну за експозиції 15 хвилин – 90 % стерильного матеріалу.

Збільшення експозиції стерилізації більш як 20 хвилин забезпечувало вихід неінфікованого матеріалу в межах 20–25 %, однак рослини виявилися не життєздатними.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
2. Бутенко Р.Г. Культуры изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 93 с.
4. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
5. Опалко А.І. Використання методів біотехнології / А.І. Опалко, О.А. Опалко // Селекція плодкових і овочевих культур: навч. посіб.: Ч. 1.: Загальні основи селекції городніх рослин / за ред. А.І. Опалка. – Умань: НДП «Софіївка» НАН України, 2012. – С. 201–233.
6. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярёв и др. – М.: Высш. школа, 1998. – 416 с.
7. Jha T.B. Plant tissue culture: Basic and applied / T.B. Jha, B. Ghosha. – Hyderabad: Universities Press, 2005. – 206 p.
8. Kutas E. The influence of sterilizing compounds on the yield of viable explants of *Rhododendron* L. (Ericaceae) / E. Kutas, L. Ogorodnik // International journal of biodiversity and conservation. – 2011. – Vol. 3, №1. – P. 24–26.
9. Miedema P. Vegetative propagation of *Beta vulgaris* by leaf cuttings / P. Miedema, P.J. Groot, J.N.M. Ziudgeest // *Euphytica*. – 1980. – Vol. 29, № 2 – P. 425–432.
10. Saunders W. A Flexible *in vitro* shoot culture propagation system for sugarbeet that includes rapid floral induction of ramets 1, 2 / J.W. Saunders // Crop science. – 1982. – Vol. 22, № 6. – P. 1102–1105.
11. Singh M.P. Plant tissue culture / M.P. Singh, S. Kumar. – New Delhi: APH Publishing, 2009. – 286 p.
12. Щерба І.В. Морфолого-біологічні особливості вирощування видів *Prunus Serrulata* LINDL. / І.В. Щерба, В.В. Полищук // Матер. Всеукр. наук. конф. мол. вчених. – Умань, 2015. – 137 с.

#### REFERENCES

1. Butenko R.G. Biologija kletok vysshih rastenij *in vitro* i biotehnologii na ih osnove: ucheb. posobie / R.G. Butenko. – М.: FBK-Press, 1999. – 160 s.
2. Butenko R.G. Kul'tury izolirovannyh tkanej i fiziologija morfogeneza rastenij / R.G. Butenko. – М.: Nauka, 1964. – 272 s.
3. Kataeva N.V. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij / N.V. Kataeva, R.G. Butenko. – М.: Nauka, 1983. – 93 s.
4. Kunah V.A. Biotehnologija likars'kyh roslin. Genetychni ta fiziologo-biohimichni osnovy / V.A. Kunah. – К.: Logos, 2005. – 730 s.
5. Opalko A.I. Vykorystannja metodiv biotehnologii' / A.I. Opalko, O.A. Opalko // Selekcija plodovyh i ovochevyh kul'tur: navch. posib.: Ch. 1.: Zagal'ni osnovy selekcii' gorodnih roslin / za red. A.I. Opalka. – Uman': NDP «Sofii'vka» NAN Ukrainy, 2012. – S. 201–233.
6. Sel'skohozhajstvennaja biotehnologija / V.S. Sheveluha, E.A. Kalashnikova, S.V. Degtjarjov i dr. – М.: Vyssh. shkola, 1998. – 416 s.
7. Jha T.B. Plant tissue culture: Basic and applied / T.B. Jha, B. Ghosha. – Hyderabad: Universities Press, 2005. – 206 p.
8. Kutas E. The influence of sterilizing compounds on the yield of viable explants of *Rhododendron* L. (Ericaceae) / E. Kutas, L. Ogorodnik // International journal of biodiversity and conservation. – 2011. – Vol. 3, №1. – P. 24–26.
9. Miedema P. Vegetative propagation of *Beta vulgaris* by leaf cuttings / P. Miedema, P.J. Groot, J.N.M. Ziudgeest // *Euphytica*. – 1980. – Vol. 29, № 2 – P. 425–432.
10. Saunders W. A Flexible *in vitro* shoot culture propagation system for sugarbeet that includes rapid floral induction of ramets 1, 2 / J.W. Saunders // Crop science. – 1982. – Vol. 22, № 6. – P. 1102–1105.
11. Singh M.P. Plant tissue culture / M.P. Singh, S. Kumar. – New Delhi: APH Publishing, 2009. – 286 p.
12. Shherba I.V. Morfologo-biologichni osoblyvosti vyroshhuvannja vydiv *Prunus Serrulata* LINDL. / I.V. Shherba, V.V. Polishhuk // Mater. Vseukr. nauk. konf. mol. vchenyh. – Uman', 2015. – 137 s.

#### Стерилизация соматических почек исходных форм сакуры *Prunus serrulata* L. для введения *in vitro* В.В. Полищук, И.В. Щерба

Приведены результаты исследований по оптимизации техники подготовки соматических почек исходных форм сакуры (*Prunus serrulata* L.) для ввода *in vitro*, а также подбор стерилизатора, его концентрации, экспозиции обработки и других параметров проведения эффективной стерилизации. Установлены особенности применения общепользуемых и новых стерилизаторов и подобраны оптимальные режимы для эффективной стерилизации соматических почек исходных форм сакуры (*Prunus serrulata* L.).

Доказано, что наиболее эффективным стерилизатором соматических почек выходных форм сакуры (*Prunus serrulata* L.) является 15 % раствор хлорамина при экспозиции 15 минут – 90 % стерильного материала.

**Ключевые слова:** исходный материал, сакура, селекция, эксплант, стерилизация, *in vitro*, вишня, биотехнология, интродукция, цветение, классификация, морфологические признаки.

**Sterilisation of somatic buds of *Sacura Prunus Serrulata L.* initial material for *in vitro* introduction**

**V. Polishchuk, I. Shcherba**

The article presents the results of research on the optimization of the techniques of preparing somatic buds of cherry (*Prunus serrulata L.*) initial forms for introduction *in vitro*, as well as the sterilizer selection, its concentration, processing exposure time and other parameters to perform an effective sterilization. The authors give a description of commonly used and novel sterilizers and their characteristics and describe the optimum conditions for effective sterilization of the initial forms of cherry (*Prunus serrulata L.*) somatic buds.

While selecting a sterilization technique and a sterilizer, a biotechnologist attempts to clear the surface of the plant material from any present microorganisms, minimizing the explants damage risk caused by sterilizers, which contain toxic substances.

The main goal of this research was to tailor the conditions of sterilization, which present one of the most important stages of microclonal propagation as well as to elicit the characteristics of commonly used and novel sterilizers, and to select the optimum conditions for performing the effective sterilization of somatic buds of cherry initial forms (*Prunus serrulata L.*).

Explants were represented by somatic buds of cherry which were cut in the laminar box with a scalpel steamed at 180–200 °C and immediately transferred with sterilized tweezers to a growing medium. The growing medium was prepared according to Murashige and Skoog medium protocol modified with 6-benzyl-aminopurine (6-BAP), 1 mg/ml. The sterilizers used in this research were chloramine, biochloride of mercury and septodor forte of different solution concentration. Prior to sterilization the explants of *Prunus serrulata L.* were treated with soap and pure water for 15–20 min in order to remove surface fungal and/or bacterial contamination.

The amount of the bedded material counted 50 units for all modes of sterilization. The rest of the manipulations with plant material were performed in compliance with the standard procedures.

This research has shown that the sterilization exposure time up to one minute provides no sterile cuttings. With exposure increase from one to ten minutes sterile viable explants output was almost equal for 0.05 % mercury dichloride and septodor forte and amounted about 50-58 %, and sterilization of plant material with 10 % chloramine gave the lowest yield of cuttings varying from 14 % to 20 %.

It has also been noted that exposure time increase up to 20 minutes, as well as 0.01 % mercuric chloride application resulted in plant tissue failure as they could not withstood the load.

Explants necrosis was recorded in all the research variants, but the largest number of dead cuttings demonstrated 5-10 % chloramine sterilizer with 20-minute exposition.

The studies prove that the most effective sterilizer of somatic buds of cherry (*Prunus serrulata L.*) initial forms is a 15 % chloramine solution with 15-minute exposition that allows 90 % output of the sterile material.

Sterilization time increasing up to more than 20 minutes ensured 20-25 % output of non-infected material, but the plants were not viable.

**Key words:** initial plant material, cherry, plant breeding, explants, sterilization, *in vitro*, biotechnology, introduction, morphological characteristics.

Надійшла 25.04.2016 р.