

САДОВО-ПАРКОВЕ ГОСПОДАРСТВО

УДК 582.988:712.3(477.4)

ТУРЧИНА С.Я.

Уманський національний університет садівництва
snezhana.turchina@ukr.net

ВІДБІР ЕКСПЛАНТІВ ТА УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ ДОНОРНОГО МАТЕРІАЛУ ДЛЯ ВВЕДЕННЯ *IN VITRO* ІНТРОДУКОВАНИХ СОРТІВ *CALLISTEPHUS CHINENSIS (L.) NESS.* З МЕТОЮ ПОДАЛЬШОГО ВИКОРИСТАННЯ В ОЗЕЛЕНЕННІ

Мета. На основі оптимізації параметрів садивного матеріалу, з урахуванням біологічних особливостей удосконалено елементи і розроблено технологію вирощування високоякісного садивного матеріалу калістефусу китайського (*Callistephus Chinensis (L.) Nees*) *in vitro*. Зокрема, розроблено низку біотехнологічних прийомів для отримання самоклонів, рослин-регенерантів та їх адаптацію до умов *in vivo*. Вивчено та узагальнено дані літературних джерел українського та зарубіжного походження щодо розмноження сортів (*Callistephus Chinensis (L.) Nees*) *in vitro* та в нотальних умовах.

Методи біотехнології, зокрема мікроклональне розмноження, поряд з фундаментальними дослідженнями знайшли широке і практичне застосування у прикладних напрямках експериментальної біології. Насамперед, йдеться про збереження генофонду рослин, створення високоякісного садивного матеріалу та прискореного вегетативного розмноження.

Матеріал і методи дослідження. У дослідженнях використано 20 сортів рослин калістефусу китайського з різними важливими ознаками, походженням та напрямом використання.

Результати дослідження. У результаті проведених досліджень щодо схожості насіння найбільш декоративних сортів калістефусу китайського з різними господарсько-цінними ознаками було відібрано шість генотипів, які виділено для введення *in vitro* з метою прискореного їх розмноження.

Обговорення. Для цього у лабораторних умовах, при температурі 18–20 °С і вологості 75–80 %, зібране насіння, яке попередньо було відібрано у кількості 100 шт., поетапно, а саме по 10 шт., поміщали у колбу з дистильованою водою на термін до 20–30 хв. Через проміжок часу насіння з невиповненим зародковим мішком піднімалося на поверхню колби і становило для різних генотипів від 10 до 30 %.

Висновки. Підібрано оптимальні фізичні умови культивування донорного матеріалу та відпрацьовано механізм добору виповнених насінневих зачатків досліджуваних генотипів.

Ключові слова: вихідний матеріал, калістефус китайський, сорти, інтродукція, *in vitro*, господарсько-цінні ознаки, генотип.

doi: 10.33245/2310-9270-2019-146-1-85-90

Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень. Квіткові рослини, у яких період росту і розвитку від сівби насіння до збирання проходить протягом одного вегетаційного періоду, віднесено до однорічних. До них відносять також квіткові рослини, які за своїми біологічними особливостями є багаторічниками, однак в різних умовах культивування онтогенез проходить за один рік [1].

Рід *Callistephus chinensis (L.) Ness.* походить з Далекого Сходу Росії, північних і північно-східних районів Китаю, а також Монголії і Японії. Систематика роду *Callistephus chinensis (L.) Ness.* змінювалася протягом тривалого періоду культивування. Там досі айстра збереглася у дикому стані, вона росте переважно на скелях і глиняно-кам'янистих ґрунтах південних гірських схилів у зоні широколистяних лісів [2].

Нині центр світової селекції айстри однорічної знаходиться в Німеччині. Створенням нових сортів також займаються в США, Голандії, Данії, Швеції, Росії, Чехії, Японії, Польщі та в Україні. Значних успіхів досягли фірми Бурпі в США, Вайбул у Швеції, Ольсен Енке у Данії, в Інституті селекції рослин у Кведлінбурзі та Ерфурті (Німеччина), де вирощують і поширюють не тільки сорти власної селекції, але й французькі, американські та з багатьох інших країн світу [3].

Істотне збільшення врожайності сільськогосподарських культур за останні десятиліття призвело до виникнення економічних і екологічних проблем, пов'язаних із забрудненням навколи-

шнього середовища, виснаженням енергетичних ресурсів, зростанням витрат на одиницю продукції. Крім того, додатковий прогрес у поліпшенні якості найважливіших сільськогосподарських культур із застосуванням класичних методів генетики і селекції досяг своєї межі. Пошук нових підходів, які дали б змогу не тільки підвищити врожаї і поліпшити якість основних сільськогосподарських культур, а й були економічно вигідніші у виробництві і не завдавали шкоди навколишньому середовищу, зумовив використання в практиці народного господарства методів сучасних біотехнологій [4].

Мета дослідження. Мета роботи полягала у виявленні особливостей прояву господарсько-цінних ознак у досліджуваних сортів калістефусу китайського, дослідженні декоративних властивостей кращих генотипів для використання в озелененні із застосуванням біотехнологічної ланки.

Завданням дослідження було оцінювання досліджуваних сортів за декоративними властивостями та добір кращих для введення в культуру *in vitro*. Для виконання цього завдання необхідно провести низку відповідних заходів:

- вивчити та узагальнити дані літературних джерел українського та зарубіжного походження щодо розмноження;
- визначити інтенсивність проростання насіння досліджуваних сортів у лабораторних і польових умовах.

Упродовж останніх десятиріч методи біотехнології знаходять все більше застосування в селекції рослин та насінництві. Трав'янисті рослини, такі як суниця, картопля, багато овочевих, деякі лікарські та інші здатні до вегетативного розмноження традиційними методами культури, успішно вводяться в *in vitro* і можуть досягати високих показників коефіцієнта розмноження. Однак прискорене розмноження дефіцитних генотипів *in vitro* має сенс лише тоді, коли в процесі мікроклонування спадковість особини, що розмножується, залишається недоторканою.

Сучасна біотехнологія рослин – сума технологій, які розвинені із молекулярної та клітинної біології рослин, це нова стадія в розвитку технології селекції рослин [1].

За допомогою цих технологій поліпшення ознак може відбуватися на рівні індивідуального гена, а окремі гени, що визначають певну ознаку, можна ідентифікувати. За ними може бути проведено відбір, їх можна ізолювати, ввести, вилучити або модифікувати в генотипі рослини чи в сорті. Внесок біотехнології у різні галузі, у тому числі квітникарство, полягає у спрощенні традиційних методів розмноження рослин, розробці нових технологій, що дають змогу підвищити ефективність сільського господарства. Методами генетичної та клітинної інженерії створено високопродуктивні та стійкі до шкідників, хвороб і гербіцидів рослини. Розроблено техніку оздоровлення рослин від накопичення інфекцій, що особливо важливо для культур, які розмножуються вегетативно (картопля та ін.). Однією із актуальних проблем є можливість керувати процесом азотфіксації, у тому числі можливість введення генів азотфіксації з геном корисних рослин, а також керування процесами фотосинтезу. Проводять дослідження з поліпшення амінокислотного складу рослинних білків, розробляють нові регулятори росту, мікробіологічні засоби захисту рослин від шкідників та хвороб, бактеріальні добрива [2].

Основним завданням було вдосконалення методів мікроклонального розмноження генотипів калістефусу китайського, їх адаптації та використання в озелененні.

Матеріал і методи дослідження. У дослідженнях використано 20 сортів рослин калістефусу китайського з різними важливими ознаками, походженням та напрямом використання. Характеристику сортів наведено у таблиці 1.

У результаті проведених досліджень було виділено шість генотипів калістефусу китайського за важливими господарсько-цінними ознаками, які в подальшому використали для введення *in vitro*.

При організації робіт по культурі тканин використовували приміщення, в яких проводять наступні операції:

- приготування, стерилізація та зберігання живильних середовищ;
- виконання робіт із чистими культурами (операційна);
- культивування експлантів (термостатно-світлова кімната);
- стерилізація живильних середовищ, посуду, інструментів, спецодягу (автоклавно);
- підсобні приміщення.

Посуд, інструменти стерилізували в сушильних шафах сухим гарячим повітрям дві години при температурі +140 °С.

Під час роботи в ламінар-боксі інструменти утримували в посудині з 96 % етиловим спиртом і після кожної маніпуляції їх обпалювали в полум'ї спиртівки.

Таблиця 1 – Характеристика сортів

| № з/п | Назва сорту | Походження | Сортотип | Продуктивність, г/куща | Напрямок використання |
|-------|--------------------|----------------|---------------------|------------------------|-----------------------|
| 1 | Кінг Сайз | Німеччина | Півонієподібна | 3,0-4,0 | універсал. |
| 2 | Анастасія (куп.) | ІС НААН | | 3,0-3,5 | універсал. |
| 3 | Анастасія (Соф.) | ІС НААН | | 3,0-3,5 | універсал. |
| 4 | Салмон Турм | Німеччина | | 2,5-3,0 | універсал. |
| 5 | Оксана | ІС НААН | | 2,5-3,0 | універсал. |
| 6 | Одарка | ІС НААН | | 3,5-4,0 | на зрізку |
| 7 | Хільда | Німеччина | Принцеса | 4,5-5,0 | на зрізку |
| 8 | Принцеса (красная) | ІС НААН | | до 6 | на зрізку |
| 9 | Александра | Німеччина | | 4,5-5,0 | на зрізку |
| 10 | Малиновий шар | Росія | Помпонні | до 6 | універсал. |
| 11 | Зімняя вішня | Західна Європа | | 2,0-2,5 | універсал. |
| 12 | Голубая луна | Західна Європа | | 2,0-2,5 | на зрізку |
| 13 | Софія | ІС НААН | Художня | 3,0-3,5 | універсал. |
| 14 | Лебедине озеро | ІС НААН | Художня | 2,0 | на зрізку |
| 15 | Есмеральда | Німеччина | Куляста | 3,0-3,5 | на зрізку |
| 16 | Оксамит | ІС НААН | | 2,0-2,5 | універсал. |
| 17 | Сєдая Дама (синя) | Росія | Дюшес | 2,5-3,0 | на зрізку |
| 18 | Веснянка | ІС НААН | Трояноподібна | 4,0 | універсал. |
| 19 | Сніжана | ІС НААН | Лаплата | 3,0 | на зрізку |
| 20 | Янтарна | ІС НААН | Американська кущова | 3,5 | на зрізку |

Вату, марлю, халати, пробки, воду, живильні середовища стерилізували в автоклаві. Матеріали стерилізували в автоклаві при тиску у дві атмосфери (температура +133 °С) протягом 30 хвилин.

Для стерилізації приміщень використовували ртутно-кварцеві та бактерицидні лампи. Світильники з лампами розміщено під стелею в різних місцях боксу і в тамбурі.

Результати дослідження. На основі оптимізації параметрів садивного матеріалу, з урахуванням біологічних особливостей, удосконалити елементи і розробити технологію вирощування високоякісного садивного матеріалу калістефусу китайського (*Callistephus Chinensis* (L.) Nees) *in vitro*, зокрема, розробити низку біотехнологічних прийомів для отримання самоклонів, рослин регенерантів та їх адаптації до умов *in vivo*.

У результаті проведених досліджень щодо схожості насіння найбільш декоративних сортів калістефусу китайського з різними господарсько-цінними ознаками було виділено шість генотипів, які введено *in vitro* для прискореного розмноження.

Використання різноманітних стресових чинників у якості провокаційних фонів [3, 4] традиційно застосовують у селекції, зокрема в *in vitro* квіткових рослин [5, 6]. Однак технологія прискореного розмноження насінневого потомства *in vitro* з рослин, які характеризуються найвищими показниками декоративності, виявилась досить ефективною [7].

Відомо, що в 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 [8].

Згідно з поставленою метою прискореного розмноження, в позасезонний період в якості експлантів використовували насіння сортів калістефусу китайського, вирощеного у полі.

Загальноприйнятий процес мікроклонального розмноження, незалежно від типу експлантів, можна умовно розділити на чотири головні етапи [9]:

- стерилізація рослинного матеріалу і введення експлантів на живильне середовище;
- проліферація (швидке розмноження);
- гемо- і ризогенез (індукування розвитку мікропагонів і коренів);
- адаптація вкорінених пробіркових рослин до нестерильних умов *ex vitro*.

У процесі підготовки до мікроклонального розмноження було поставлено завдання методичного плану – відібрати найефективніші експланти і підготувати їх для наступного мікроклонального розмноження.

Основною метою більшості вчених-селекціонерів є розмноження, а також часткове створення перспективних генотипів декоративних рослин біотехнологічними методами. Це дасть змогу швидко, без значних затрат отримати велику кількість рослинного матеріалу з необхідними маркерними ознаками [10].

Ще на початку минулого століття в бувшому Радянському Союзі активно проводили пошук нетрадиційних шляхів підвищення ефективності селекційної роботи з метою створення більш продуктивних і стійких сільськогосподарських рослин. У зв'язку з цим, одним із завдань є введення насіння, а в інших випадках – рослинних тканин і клітин *in vitro*, які дозволяли б отримувати потрібні форми в кількості, достатній для селекції [10].

Але багато аспектів цієї проблеми, які мають значення для підвищення ефективності існуючих методик, ще мало вивчено. Дискусійними залишаються питання, які стосуються розуміння закономірностей протікання морфогенетичних процесів, їх залежності від генотипу рослин, типу і фізіологічного стану експланта, низки інших культуральних чинників. Зусилля багатьох селекціонерів в основному направлені на активізацію умов культивування і вдосконалення прописів живильних середовищ [8].

Обговорення. Дослідження з культивування донорного матеріалу калістефусу китайського (*Callistephus Chinensis* (L.) Nees) проводили в лабораторії біотехнології кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва. Насіння цього сорту відбирали по 100 шт. з метою перевірки його на вповненість зародкового мішка, що дало змогу виключити насіння, зародковий мішок у якого був не сформований або сформований не повністю (рис. 1).

Для цього у лабораторних умовах, при температурі 18–20 °С і вологості 75–80 %, зібране насіння, яке попередньо було відібрано у кількості 100 шт., поетапно, а саме по 10 шт., поміщали у колбу з дистильованою водою на термін до 20–30 хв. Через проміжок часу насіння з невивченим зародковим мішком піднімалося на поверхню колби і становило для різних генотипів від 10 до 30 %.

Висновки. Дослідженнями виділено основні сорти та вихідні матеріали калістефусу китайського з використанням біотехнологічної ланки. Тобто підібрано оптимальні фізичні умови культивування донорного матеріалу та відпрацьовано механізм добору вивчених насінневих зачатків досліджуваних генотипів. Розроблено ефективні способи та підібрано умови, включно з модифікацією живильного середовища, з метою подальшої розробки нових технологій виробництва високоякісного садивного матеріалу калістефусу китайського (*Callistephus Chinensis* (L.) NEES).

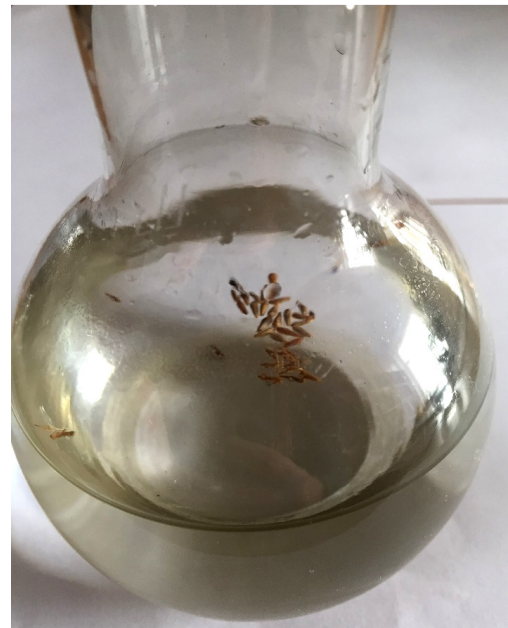


Рис. 1. Оцінювання насіннєвого матеріалу сортів калістефусу китайського на вповненість зародкового мішка.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Angiosperm Phylogeny Group III (APG III). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linnean Society. London, 2009. Vol. 161. P. 105–121.
2. Горай А.А. Интродукция и селекция астры однолетней *Callistephus chinensis* (L.) Nees в Национальном ботаническом саду им. М. М. Гришко НАН Украины. Роль ботанических садов в сохранении разнообразия растений: материалы юбилейной международной конференции, посвященной 100-летию Батумского ботанического сада (Батуми Грузия, 8–10 мая, 2013 г.). Батуми, 2013. Ч. II. С. 269–270.
3. Опалко А.І., Опалко О.А. Використання методів біотехнології. Селекція плодових 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.

4. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Transcriptional regulatory network since ll ular responses and to le rance to dehydration and cold stresses. Annual review of plant biology. 2006. Vol. 57. P. 781–803.
5. Nagl N., Maksimovic I., Curcicat Z. Effect of induced water deficit on sugar beet micropropagation. Proceedings of 72nd IIRB Congress (22–24 Jun, 2010, Copenhagen, Denmark): International institute for beet research (IIRB). Bruxelles. 2010. P. 179–185.
6. Шевель Л.О., Алексеева Н.М. Айстри з Китаєво. Квіти України. 2000. №8. С. 5–7.
7. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К.: Логос, 2005. 730 с.
8. Tai G.C. Genotypic stability analysis and its application to potato regional trials. Crop. Sci. 1971. Vol. 11. No 2. P. 184–190.
9. Jugenheimer R.W. Performance and variability of various types of cornhybrids. Amer. Soc. Agron. Abs. 1957. Vol. 3. 55 p.
10. Синская Е.Н. Проблема популяций у высших растений. Л.: Сельхозиздат. 1963. 124 с.

REFERENCES

1. Angiosperm Phylogeny Group III (APG III). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linnean Society. London, 2009, Vol. 161, pp. 105–121.
2. Goraj, A.A. Introdukcija i selekcija astry odnoletnej *Callistephus chinensis* (L.) Nees v Nacional'nom botanicheskom sadu im. M. M. Grishko NAN Ukrainy [Introduction and selection of asters of annual *Callistephus chinensis* (L.) Nees in the National Botanical Garden named after them M.M. Grishko National Academy of Sciences of Ukraine]. Rol' botanicheskikh sadov v sohranenii raznoobrazija rastenij: materialy jubilejnoy mezhdunarodnoj konferencii, posvjashhennoj 100-letiju Batumskogo botanicheskogo sada [The role of botanical gardens in the preservation of plant diversity: materials of the anniversary international conference devoted to the 100th anniversary of the Batumi Botanical Garden]. Batumi, 2013, part II, pp. 269–270.
3. Opalko, A.I., Opalko, O.A. (2012). Vykorystannja metodiv biotehnologii'. Selekcija plodovyh i ovochevyh kul'tur [Use of biotechnology methods. Selection of fruit and vegetable cultures]. Zagal'ni osnovy selekcii' gorodnih roslyn [Common basics of garden plant breeding]. Uman, NDP «Sofii'vka» NAAS of Ukraine, pp. 201–233.
4. Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory network since ll ular responses and to le rance to dehydration and cold stresses. Annual review of plant biology. Vol. 57, pp. 781–803.
5. Nagl, N., Maksimovic, I., Curcicat, Z. (2010). Effect of induced water deficit on sugar beet micropropagation. Proceedings of 72nd IIRB Congress (22–24 Jun, 2010, Copenhagen, Denmark): International institute for beet research (IIRB). Bruxelles, pp. 179–185.
6. Shevel', L.O., Aljeksjejeva, N.M. (2000). Ajstry z Kytajevo [Asters from Kitaevo]. Kivity Ukrai'ny [Flowers of Ukraine], no. 8, pp. 5–7.
7. Kunah, V.A. (2005). Biotehnologija likars'kyh roslyn [Biotechnology of Medicinal Plants]. Genetychni ta fiziologo-biohimichni osnovy [Genetic and physiological and biochemical bases]. Kyiv, Logos, 730 p.
8. Tai, G.C. (1971). Genotypic stability analysis and its application to potato regional trials. Crop. Sci. Vol. 11, no. 2, pp. 184–190.
9. Jugenheimer, R.W. (1957). Performance and variability of various types of cornhybrids. Amer. Soc. Agron. Abs. 1957, Vol. 3, 55 p.
10. Sinskaja, E.N. (1963). Problema populjacij u vysshih rastenij [The problem of populations in higher plants]. Lenin-grad, Sel'hozizdat, 124 p.

Отбор экплантов и условия культивирования донорных материалов для введения *in vitro* интродуцированных сортов *Callistephus Chinensis* (L.) Ness. с целью дальнейшего использования в озеленении

Турчина С.Я.

Цель. На основе оптимизации параметров посадочного материала с учетом биологических особенностей усовершенствованы элементы и разработана технология выращивания высококачественного посадочного материала калистефуса китайского (*Callistephus Chinensis* (L.) Nees) *in vitro*, в частности, разработан ряд биотехнологических приемов для получения самоклонов, растений-регенерантов и их адаптация к условиям *in vivo*. Изучены и обобщены данные литературных источников украинского и иностранного происхождения по размножению сортов (*Callistephus Chinensis* (L.) Nees) *in vitro* и в нотальных условиях.

Методы биотехнологии, в частности микроклональное размножения, наряду с фундаментальными исследованиями нашли широкое и практическое применение в прикладных направлениях экспериментальной биологии. Прежде всего речь идет о сохранении генофонда растений, создании высококачественного посадочного материала и ускоренного вегетативного размножения.

Материал и методы исследования. В исследованиях использованы 20 сортов растений калистефуса китайского с различными важными признаками, происхождением и направлением использования.

Результаты исследования. В результате проведенных исследований по всхожести семян наиболее декоративных сортов калистефуса китайского с различными хозяйственно-ценными признаками были отобраны шесть генотипов, которые выделены для введения *in vitro* с целью ускоренного их размножения.

Обсуждение. Благодаря этому в лабораторных условиях при температуре 18–200 °C и влажности 75–80 %, собраны семена, которые предварительно были отобраны в количестве 100 шт., поэтапно, а именно по 10 шт., помещали в колбу с дистиллированной водой на срок до 20–30 мин. Через промежуток времени семена с невыполненным зачаточным мешком поднимались на поверхность колбы, их количество составляло для разных генотипов от 10 до 30 %.

Выводы. Подобраны оптимальные физические условия культивирования донорного материала и отработан механизм отбора заполненных семенных зачатков исследуемых генотипов.

Ключевые слова: исходный материал, калистефус китайский, сорта, интродукция, *in vitro*, хозяйственно-ценные признаки, генотип.

Explants selection and conditions of the donor material cultivation for *Callistephus Chinensis* (L.) Ness. introduced sorts *in vitro* introduction with a view to its further use in greening

Turchyna S.

The aim. The technology of cultivating high-quality planting material of *Callistephus Chinensis* (*Callistephus Chinensis* (L.) Nees) *in vitro* has been developed on the basis of planting material parameters optimization taking into account its biological characteristics and its elements have been improved. In particular, a set of biotechnological techniques for the production of self-adhesives, regeneration plants and their adaptation to *in vivo* conditions have been developed. The data of literary sources of Ukrainian and foreign origins on the reproduction of varieties (*Callistephus Chinensis* (L.) Nees) *in vitro* and in notional conditions are studied and generalized.

Biotechnology methods, microclonal reproduction in particular, along with fundamental researches, have been widely used in the applied directions of experimental biology. First of all, it is about the plants gene pool preservation, creating the high-quality gardening material and accelerated vegetative reproduction.

Research material and methods. 20 varieties of *Chinensis Callistephus* plants with different important characteristics, origin and application direction were used in our studies.

Research results. Six genotypes were selected as a result of studies on the seeds germination of the most decorative varieties of *Callistephus Chinensis* with different economic and valuable characteristics. These were selected for *in vitro* introduction in order to accelerate their reproduction.

Discussion. For this purpose we collected previously selected 100 seeds in laboratory conditions, at a temperature of 18–20 °C and humidity of 75–80 %. The seeds were collected in a phased manner, namely 10 pieces each and placed in a flask with distilled water for a period of up to 20–30 minutes. After a period of time, seeds with an incomplete germ bag floated up to the surface of the flask and made, respectively, 10 to 30 % for different genotypes of.

Conclusions. That is, the optimal physical conditions for donor material cultivation have been selected and the mechanism for selecting the filled seed germs of the studied genotypes has been worked out.

Key words: source material, *Callistephus Chinensis*, varieties, introduction, *in vitro*, economically valuable signs, genotype.

Надійшла 19.04.2019 р.