

# ОДЕРЖАННЯ АСЕПТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ

## й індукція калюсогенезу стійкої проти каштанової мінуючої молі форми гіркокаштана звичайного

Отримано асептичну культуру стійкої проти каштанової мінуючої молі форми гіркокаштана звичайного з метою одержання рослин-регенерантів. Установлено, що найефективнішою стерилізуючою речовиною для первинних експлантатів є 50% розчин нанорозмірних частинок  $AgNO_3$ . Перспективним методом для одержання рослин-регенерантів є непрямий морфогенез з використанням модифікованого живильного середовища Мурашіге і Скуга (МС) з додаванням кінетину та 2,4-D (100 мкг/л).

**гіркокаштан звичайний, живильне середовище, експлантат, морфогенез, калюс, *in vitro***

Каштанова мінуюча міль (КММ) (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimic) є небезпечним шкідником, який використовує, як основну кормову базу, листки рослин гіркокаштана звичайного (*Aesculus hippocastanum* L.). Проте серед видів рослин роду *Aesculus* трапляються стійкі проти КММ види гіркокаштанів. За наявними даними [18], стійкими проти пошкоджень КММ, які на стадії личинки її знищують, є гіркокаштан дрібноквітковий (*Aesculus parviflora* Walt.), гіркокаштан м'ясочервоний (*Aesculus carnea* Haune), гіркокаштан голий (*Aesculus glabra* Willd) та гіркокаштан індійський (*Aesculus indica* (Camb.) Hook.). До стійких проти КММ видів гіркокаштанів належать також гіркокаштан асамський (*Aesculus assamica* Griff.), гіркокаштан каліфорнійський (*Aesculus californica* (Spach) Nutt.) та гіркокаштан китайський (*Aesculus chinensis* Bunge).

У досліджах японський вид гіркокаштана *Aesculus turbinata* Blume виявився найстійкішим проти пошкодження КММ, а азіатські ендемічні, зокрема *Aesculus assamica* Griff., *Aesculus chinensis* Bunge і *Aesculus indica* (Camb.) Hook. — високостійкими проти фітофага. У Північній Америці стійкими проти КММ є гібриди *Aesculus* × *arnoldiana* Sarg (жовтий), *Aesculus* × *hybrida* DC (жовто-рожевий, червоний) та

**О.С. ПЕНТЕЛЮК,**  
аспірант\*

**І.П. ГРИГОРЮК,**  
доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України

**С.М. КОСТЕНКО,**  
кандидат сільськогосподарських наук

**Т.В. КАЛИТА,**  
магістр

**А.Ф. ЛІХАНОВ,**  
кандидат біологічних наук  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України  
Україна, Київ, +380445278966,  
e-mail: creadleofdeath@gmail.com

*Aesculus* × *neglecta* Lindl. (червоножовтий) [16].

Визначено, що найстійкішими проти КММ є гіркокаштан дрібноквітковий (*Aesculus parviflora* Walt.), гіркокаштан м'ясочервоний (*Aesculus carnea* Haune.) та гіркокаштан восьмитичинковий (*Aesculus octandra* Marsh.). Однак у процесі інвентаризації міських насаджень загальногороду користування міста Києва нами виявлено також поодинокі дерева гіркокаштана звичайного, які не пошкоджуються КММ [2, 3, 5, 7, 9].

Механізми стійкості видів гіркокаштана проти КММ остаточно не з'ясовані. Як елемент конституціональної (від лат. *constitutio* — встановлення, устрій) стійкості рослин гіркокаштана розглядають показник товщини кутикули поверхні листка. Припущення ґрунтується на тому, що процес пошкодження листків починається на стадії виходу гусениць з яєць, які метелики КММ відкладають на адаксіальній поверхні листків [11, 12, 14, 15, 17]. Гусениці швидко порушують цілісність покривної тканини асиміляційної поверхні й проникають всередину епідермального шару листків.

Одним із перспективних методів одержання стійких проти КММ

рослин гіркокаштана звичайного є застосування методу мікроклонального розмноження в культурі *in vitro*, який дозволяє отримувати вихідні рослини, що генетично ідентичні батьківській формі. У лабораторії лісової генетики (НЛТУ України, м. Львів) оптимальних результатів досягли за умов використання апікальних і латеральних бруньок двомісячних сіянців рослин гіркокаштанів. Стерилізацію здійснювали послідовним використанням кількох стериліантів, що дало змогу одержати високий відсоток виходу стерильних рослин. Оптимальним для ініціації морфогенезу було живильне середовище Мурашіге-Скуга (МС) з відповідним набором мінеральних компонентів і вітамінів, 50 мг/л Na-Fe-EDTA, 2% сахарози та 0,8% агар-агару. Як регулятор росту використовували БАП і кінетин у концентраціях від 0,2 до 1,0 мг/л [4].

За наявними даними, для введення в культуру *in vitro* гіркокаштана звичайного доцільно використовувати меристеми листкових пластинок. Найменша кількість інфікованих експлантатів гіркокаштана звичайного спостерігалася за їх послідовної обробки 70% етанолом і 15% розчином гіпохлориту натрію. Індукція первинного калюсу відбувалась у темряві [10]. Для мікроклонального розмноження гіркокаштана звичайного рекомендовано використовувати модифіковане живильне середовище МакКоуна-Лойда (WPM) з різною концентрацією БАП та 2,4-D. Експлантати культивують на середовищі з 250 мкг/л БАП та 500 мкг/л 2,4-D з метою індукції калюсу, з якого далі на живильному середовищі без 2,4-D утворюються ембріоїди. За умов зниження концентрації БАП до 75 мкг/л відбувається активний розвиток соматичних ембріоїдів [13].

**Мета досліджень.** Оптимізувати процедуру стерилізації первинних експлантатів і одержати асептичну культуру *in vitro* для мікроклонального розмноження форми рослин

гіркокаштана звичайного, яка стійка проти КММ.

**Матеріали досліджень.** Матеріалом для мікроклонального розмноження слугували штучно пробуджені бруньки, листові та апікальні меристеми рослин гіркокаштана звичайного, які стійкі проти КММ.

Пагони рослин відбирали у середині листопада з метою штучного пробудження латеральних бруньок, для індукції яких використовували розчини з різним складом та концентрацією регуляторів росту (табл. 1).

Стокові розчини гормонів (1 мг/мл) розчиняли в 1 л дистильованої води з 50 мл макро-МС, 5 мл Fe-хелату та 0,10 мл мікро-МС, які готували за загальноприйнятими методами [6, 8].

Після декапітації активно розвинутих пагонів гіркокаштана звичайного їх обмотували бинтом, який попередньо змочували розчином гормонів й витримували у темній вологій камері протягом 2 год. Потім нижній край пагона обрізали гострим лезом у воді для запобігання явищу повітряної емболії, після чого пагони ставили у відповідні розчини і витримували у темряві. Пробудження бічних бруньок стійкої проти КММ форми рослин гіркокаштана звичайного відбувалося за 7–8 діб у розчинах №5 (БАП, ГК) і №6 (БАП, ГК, сахароза) (рис. 1). Активовані бруньки рослин зрізали і готували до стерилізації.

Для індукції пробудження квіткової бруньки свіжозрізані пагони рослин ставили у дистильовану воду з додаванням сахарози (2%) та ГК 1,5 мг/л. Стерилізацію експлантатів гіркокаштана звичайного виконува-

**1. Склад розчинів регуляторів росту для пробудження листових бруньок рослин форми гіркокаштана звичайного, мкл**

Регулятори росту	Сахароза, %
Контроль	—
ІОК (175)	—
ІОК (175) та ГК (1732)	—
ІОК (175) та БАП (225,2)	—
БАП (225,2) та ГК (1732)	—
БАП (225,2), ГК (1732)	2,0

ли за наступною схемою: листові пластинки і молоді пагони протягом 15 хв промивали мильним розчином з подальшим промиванням проточною та дистильованою водою. Далі стерилізацію рослинного матеріалу здійснювали в ламінарному боксі з дотриманням асептичних умов за загальноприйнятою методикою [6, 8] з власною модифікацією. З метою руйнування воскового шару на листках і посилення дії стерилізуючих речовин експлантати обробляли впродовж 20-ти секунд 70% етиловим спиртом. Для стерилізації листки гіркокаштана звичайного 8 хв обробляли 0,1% розчином сулеми (HgCl<sub>2</sub>) та двічі промивали у дистильованій воді по 15 хв. Бруньки стерилізували у 50% розчині нанорозмірних частинок AgNO<sub>3</sub> впродовж 25 хв з наступним промиванням у дистильованій воді — 30 хв.

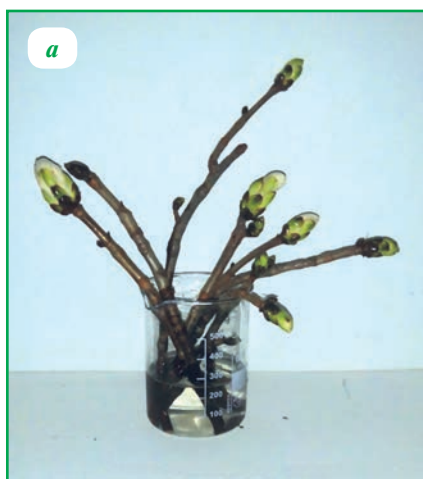
Для запобігання розвитку епіфітних мікроорганізмів і грибів на поверхнях експлантатів й калюсу за їх пасажування до охолодженого живильного середовища додавали пропущений через бактеріальний фільтр антибіотик цефотаксим (100 мг/л).

Для пагоноутворення використо-

ували живильне середовище МС з додаванням БАП (1 мг/л) та безгормональне з активованим вугіллям (2 г/л). Для індукції калюсогенезу гіркокаштана звичайного використовували модифіковане живильне середовище МС [6, 19] з додаванням кінетину та 2,4-D (100 мкг/л).

**Результати досліджень.** У процесі стерилізації листків і пагонів інтактних рослин форми гіркокаштана звичайного, яка стійка проти КММ, нами використано різні концентрації стерилізуючих речовин та час стерилізації (табл. 2). У результаті підібрано найоптимальніші стерилізанти і процедуру їх використання. Установлено, що за умов використання 0,1% розчину HgCl<sub>2</sub> ефективність стерилізації експлантатів становила 75%, а 50% розчину нанорозмірних частинок AgNO<sub>3</sub> — 90%.

За умов введення в культуру *in vitro* фрагментів однорічних пагонів з одним або двома міжвузлями і бруньками активацію росту апікальних меристем на безгормональному живильному середовищі МС нами не виявлено. Це свідчить, що для даної форми рослин гіркокаштана звичайного загальний пул ендогенних фітогормонів є недостатнім для ініціації пагоноутворення і потребує додаткових гормональних стимулів. Рослинний матеріал з видимими ознаками наявності епіфітної мікробіоти переносили на живильне середовище МС з додаванням БАП у концентрації 500 мкг/л і антибіотика цефотаксима. За таких умов культивування інфекція значно пригнічувалась, проте повністю не зникала. Одержані асептичні експлантати стійкої проти КММ форми гіркокаштана звичайного на живильному середовищі МС з додаванням БАП виявляли початкові ознаки активації процесів росту. Це супроводжувалось збільшенням об'ємів листової бруньки і розростанням тканин примордіїв листків. Експлантати зберігали у темряві з метою уповільнення утворення фенолів, які пригнічують їх ріст за умов висадження на живильне середовище (рис. 2, а). За умов травматичних ушкоджень тканин листової пластинки на адаксіальному боці з'являлись перші ознаки калюсоутворення. Індукція первинного калюсу проходила в умовах темряви. Калюсоутворення відбувалось на 10–12-ту добу культивування. Калюсна тканина була щільною і світло-зеленого кольору (рис. 2, б). За умов нещільного кон-

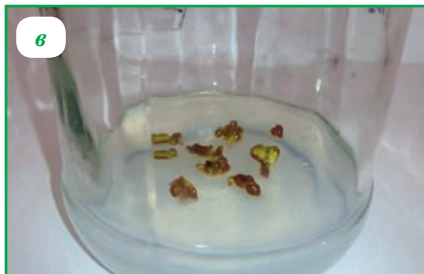
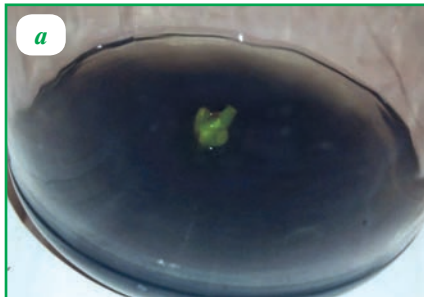


**Рис. 1. Пагони стійкої проти КММ форми гіркокаштана звичайного після штучної гормональної стимуляції: а — активація росту квіткових бруньок; б — формування листків бічних бруньок**



## 2. Ефективність стерилізації бруньок рослин гіркогокаштана звичайного

Стерилізуюча речовина	Концентрація, %	Час стерилізації, хв	Кількість експлантів, шт.	Ефективність стерилізації	
				Шт.	%
Гіпохлорит натрію (NaClO)	1,0	10	20	8	40
Перекис водню (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	20,0	15	20	11	55
Сулема (HgCl <sub>2</sub> )	0,1	10	20	15	75
Нітрат срібла (AgNO <sub>3</sub> )	50,0	10	20	18	90



**Рис. 2.** Культура тканин форми гіркогокаштана звичайного, яка стійка проти КММ, *in vitro*: а — асептичний експлантат гіркогокаштана звичайного на живильному середовищі МС з додаванням БАП та цефотаксиму; б — утворення первинного неморфогенного калюсу з листків; в — асептичні експлантати гіркогокаштана звичайного в культурі *in vitro*; г — калюсогенез на тканинах зав'язі гіркогокаштана звичайного в культурі *in vitro*

такту листка з поверхню живильного середовища ушкоджені тканини листка відмирали, що створювало додаткові бар'єри для інтенсивнішого транспорту води і поживних речовин в калюсогенні зони.

За 7—10 діб неморфогенний калюс поступово зневоднювався, зменшувався в об'ємі і втрачав життєздатність. Збільшення біомаси калюсної тканини було характерним лише в місцях безпосереднього контакту листової поверхні з живильним середовищем. Отже, за умов додавання до живильного середовища регуляторів росту в листках стійкої проти КММ форми рослин гіркогокаштана звичайного достатньо індукувати процеси калюсогенезу, проте його зберігання і збільшення маси сирі речовини суттєво залежить від техніки проведення мануальних операцій. Для ініціації морфогенних процесів неморфогенний калюс ізольовували і пасажували на живильне середовище МС із додаванням регуляторів росту.

Таким чином, розмноження стійкої проти КММ форми гіркогокаштана звичайного можливе шляхом застосування методів мікрোকлонального розмноження. Найефективнішим виявився спосіб непрямого морфогенезу через послідовну ініціацію калюсогенезу — дедиференціацію і диференціацію тканин з отриманням морфогенних структур з подальшим формуванням рослин-регенерантів форми гіркогокаштана звичайного, яка стійка проти КММ.

### ВИСНОВКИ

Показано високу ефективність обробки первинного рослинного матеріалу 70% етиловим спиртом (20 с) і 0,1% розчином сулеми (8 хв) для одержання життєздатних асептичних експлантів форми гіркогокаштана звичайного, яка стійка проти КММ.

Встановлено, що тканини листків форми гіркогокаштана звичайного, яка стійка проти КММ, чутливі до гормональних стимулів. Індукція калюсогенезу проявлялась на 10—12-ту добу за умов культивування експлантів на модифікованому живильному середовищі МС з додаванням кінетину та 2,4-D (100 мкг/л). Це відкриває широкі перспективи для мікрোকлонального розмноження цінної форми рослин гіркогокаштана звичайного, яка стійка проти КММ, через непрямий морфогенез, тобто утворення рослин-регенерантів із первинного або субкультивованого калюсу.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Артамонов В.И. Растения и чистота природной среды / В.И. Артамонов. — М.: Наука, 1986. — 172 с.
2. Біологія каштанів / І.П. Григорюк, С.П. Машковська, П.П. Яворовський, О.В. Колесніченко. — К.: Логос, 2004. — 380 с.
3. Григорюк І.П. Фізіологічні і молекулярні основи стійкості видів рослин роду *Aesculus* L. проти каштанової мінуючої молі / І.П. Григорюк, Т.Л. Лук'яненко. — К.: ЦП «Компринт», 2015. — 174 с.
4. Гузь М.М. Особливості розмноження *in vitro* гіркогокаштана звичайного / М.М. Гузь, Р.М. Гречаник, В.Ф. Гевал // Лісівнича академія наук України: Відтворення та покращення лісових ресурсів. — Л.: 2007. — Вип. 5. — С. 89—91.
5. Зерова М.Д. Каштановая минирующая моль в Украине / М.Д. Зерова, Г.Н. Никитенко, Н.Б. Народський і др. — К.: ТОВ «Вегес», 2007. — 87 с.
6. Кушнір Г.П. Мікрোকлональне розмноження рослин, теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. — К.: Наук. думка, 2005. — 270 с.
7. Левон Ф.М. Современное состояние и проблемы сохранения конского каштана обыкновенного в зеленых насаждениях г. Киева / Ф.М. Левон, А.А. Ильенко, Н.А. Назарова // Проблемы озеленения крупных городов: матер. XI Международ. научн.-практ. конф. — М.: Изд-во «Фантом», 2008. — С. 108—110.
8. Мусієнко М.М. Біотехнологія рослин. Навч. посіб. / М.М. Мусієнко, О.О. Панюта. — К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. — 114 с.
9. Пентелюк О.С. Анатомо-фізіологічні ознаки стійкості рослин гіркогокаштана звичайного проти каштанової мінуючої молі / О.С. Пентелюк, А.Ф. Ліханов, І.П. Григорюк // «Наукові доповіді НУБіП України». Електронний фаховий журнал. — 2016. — № 3 (60) (червень). — 13,5 с. Режим доступу до журн.: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/6824>.
10. Чеченева Т.М. Введення в культуру *in vitro* різних видів гіркогокаштана (рід *Aesculus* L.) / Т.М. Чеченева, К.Є. Шаванова, С.П. Машковська // Физиология и биохимия культур. растений — 2010. — 42, № 2. — С. 132—136.
11. Chawla H.S. Introduction to Plant Biotechnology / H.S. Chawla — 2nd ed — 2002. — P. 123—127.
12. Grabenweger G. Parasitism of different larval stages of *Cameraria ohridella*, Biocontrol. — 2003. — 48. — P. 671—684.



13. Jorgensen J. Somatic embryogenesis in *Aesculus hippocastanum* L. by culture of filament callus / J. Plant Physiol. — 1989. — 135. — P. 240—241.

14. Kukula-Mlynarczyk A. Incidence, harmfulness and some elements of the horse chestnut leafminer (*Cameraria ohridella* Deschka and Dimic) control on horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) / Poland: Journal of Plant Protection Research — 2007 — P. 47—53.

15. Finding the Area of Origin of the Horse-Chestnut Leaf Miner: a Challenge / [M. Kenis, S. Girardoz, N. Avtzis et al.] // Forest Insect Population Dynamics and Host Influences. — 2003. — 53. — P. 63—66.

16. Salleo S. Effects of defoliation caused by the leaf miner *Cameraria ohridella* on wood production and efficiency in *Aesculus hippocastanum* L. growing in north-eastern / S. Salleo, A. Nadin, F. Raimondo, M. Logullo // Trees-Berlin. — 2003. — 17, № 4. — P. 367—375.

17. Samek T. Infekci kukel klinenky jirovcove *Cameraria ohridella* Deschka et Dimič entomopatogennimi houbami / L. Jankovsky, D. Novotny, K. Poznamky // In : Sbor. z konf. Mykologicka fytopatologie ve 20. a 21. století. — Praha: VURV, 2000. — P. 114 — 118.

18. Skuhravy V. Zusammenfassende Betrachtung der Kenntnisse über die Rosskastanienminiermotte, *Cameraria ohridella* Desch. & Dem.

(Lep., Gracellaridae) / Anzeiger für Schadling-skunde. — 1999. — 72, № 4. — P. 95—99.

19. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. — 1962. — 15, № 3. — P. 473—497.

**Пентелюк Е.С., Григорюк І.А., Костенко С.Н., Калита Т.В., Лиханов А.Ф.**

**Получение асептического материала и индукция каллусогенеза устойчивой к каштановой минирующей моли формы каштана конского обыкновенного**

Получено асептическую культуру устойчивой к каштановой минирующей моли формы каштана конского обыкновенного с целью получения растений-регенерантов. Установлено, что наиболее эффективным стерилизующим веществом для первичных эксплантов является 50% раствор наноразмерных частиц  $AgNO_3$ . Перспективным методом для получения растений-регенерантов является непрямой морфогенез с использованием модифицированной питательной среды Мурашиге и Скуга (МС) с добавлением кинетина и 2,4-D (100 мкг/л).

**конский каштан обыкновенный, питательная среда, экспланты, морфогенез, каллус, *in vitro***

**Penteliuk O.S., Grigoryuk I.P., Kostenko S.M., Kalyta T.V., Likhhanov A.F.**

**Getting aseptic material and the induction of callus resistance form of common horse chestnut against chestnut miner moth**

We have got the aseptic culture of common horse chestnut resistant to chestnut leaf miner with the aim to obtain plants regenerants. It is determined that the most effective sterilizing agent for primary explants is 50 % solution of nano-sized particles  $AgNO_3$ . It is promising method for the obtaining plants regenerants by indirect morphogenesis using modified culture medium and Murashihe Skuha (MS) with the addition of kinetin and 2,4-D (100 mg/l).

**common horse chestnut, nutrient medium, explants, morphogenesis, callus, *in vitro***

Рецензент:

Клюваденко А.А.,  
кандидат сільськогосподарських наук  
УЛЯБП АПК

УДК 631.51+632.51

© С.В. Маслійов, 2016

## ЧОРНИЙ ПАР, ЯК ЕФЕКТИВНИЙ СПОСІБ ЗАХИСТУ ВІД БУР'ЯНІВ

Наведено результати експериментальних даних ефективних технологічних елементів протибур'янового комплексу на чорному парі. У досліді вивчали ефективність: системного гербіциду суцільної дії Геліос (4,00 л/га); селективного системного гербіциду Дианат, як провідника (0,15 л/га); аміачної селітри, як пом'якшувача жорсткої води; бакової суміші усіх, вище вказаних складових. Надано дані щодо кількісно-видового складу бур'яневої рослинності. Наведено опис найпоширеніших бур'янів, таких як: осот рожевий, нетреба звичайна, молочай лозний, мишій зелений, березка польова. Надано схему польового дослідження та показники ефективності дії гербіцидів на різних методах обробки. Сформульовано рекомендації щодо приготування робочого розчину та оптимальної технології контролювання бур'янової рослинності.

**чорний пар, бур'яни, контролювання, системний гербіцид, селективний системний гербіцид,**

**С.В. МАСЛІЙОВ,**

доктор сільськогосподарських наук  
msv-lug@mail.ru

Луганський національний університет  
імені Тараса Шевченка  
+38 050 470 13 31

**аміачна селітра, бакова суміш, забур'яненість, ефективність, робочий розчин, оптимальні технології**

Збільшення виробництва зернової продукції — одне з головних завдань агропромислового виробництва України. На всіх етапах становлення землеробства бур'яни були найбільш негативним чинником, який перешкоджав формуванню високого рівня врожаю, підвищенню продуктивності культурних рослин і збільшенню валових зборів сільськогосподарської продукції.

Останнім часом на оброблю-

ваних землях зони Степу України помітно зросла рясність бур'янів, які здавна добре пристосувалися до навколишніх природних умов. Тому впродовж багатьох років степові хлібороби намагаються захистити свої поля від бур'янової рослинності. Саме через це так багато уваги приділяється вивченню видового складу і біологічних особливостей розвитку бур'янів [8].

Спостереження й обліки свідчать, що кількісно-видовий склад бур'янів не залишається незмінним. Важливу роль у цьому процесі відіграє сформована попередньо засміченість орного шару ґрунту насінням і вегетативними органами розмноження бур'янів.

Останнім часом значно зросла на цих землях рясність осоту рожевого, нетреби звичайної, молочая лозного, мишію зеленого, березки польової.

**Осот рожевий** (осот розовий, бодяк полевої, *Cirsium arvense*) зу-