

І. ЛІСОВЕ ТА САДОВО-ПАРКОВЕ ГОСПОДАРСТВО

УДК 630*174.754:631.544

Докторант М.М. Лісовий, канд. с.-г. наук –
НЛТУ України, м. Львів

ОСОБЛИВОСТІ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ТА ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ЕКСПЛАНТІВ *TAXUS BACCATA* L.

Проведено критичний аналіз та стислий огляд літературних джерел, які стосуються досліджуваної тематики. Детально описано застосовану методику проведених досліджень: вихідний рослинний матеріал, який застосовували як експланти під час мікроклонування *Taxus baccata* L.; черговість використання хімічних реагентів, їх концентрації та тривалість обробітку під час стерилізації; види та модифікації живильних середовищ. Встановлено оптимальну схему деконтамінації вихідного рослинного матеріалу досліджуваного виду та виявлено оптимальний склад середовища та комбінації фітогормонів для проведення успішної ініціації експлантів. Узагальнено та проаналізовано отримані результати.

Ключові слова: *Taxus baccata* L., *in vitro*, експлант, стерилізація, ініціація, живильне середовище, деконтамінація.

Вступ. *Taxus baccata* L. (тис ягідний) – хвойне вічнозелене дерево або великий чагарник (родина тисових (*Taxaceae*)), який є реліктовим видом мезозойської ери. В умовах природного ареалу може сягати висоти 10-25 м [4-6, 12-13]. Досліджуваний вид занесено до Червоної книги України з присвоєним природоохоронним статусом – "вразливий". Окрім цього, популяції тиса ягідного занесено до Зеленої книги України, які охороняють у Карпатському БЗ, Кримському, Ялтинському гірсько-лісовому ПЗ та низці заказників [13].

Завдяки своїй міцній та важкій деревині, із чорно-бурою серцевиною, тис ягідний дуже ціниться у меблевій промисловості, машинобудуванні, підводному будівництві тощо. Для *Taxus baccata* L. властива наявність значної кількості декоративних форм (внутрішньовидовий поліморфізм), що робить його досить поширеним в озелененні та садово-парковому господарстві. Також тис ягідний має протипухлинну, цитостатичну дію та збуджує дихання. Тому у медицині застосовують хвою, пагони та кору досліджуваного виду як джерело біомаси для отримання таксотеру, що є складовою протипухлинних препаратів [7, 12]. Все це і зумовлює актуальність та необхідність удосконалення шляхів розмноження цінних генотипів *Taxus baccata* L.

Огляд літератури. Мікроклонування рослин досліджено у багатьох наукових працях. Проте статей, які стосуються розмноження *in vitro* тиса ягідного, є обмежена кількість. Так, Л.Г. Філонова (1999) у своїй роботі вводила в культуру *in vitro* різні тканини та органи тиса ягідного та вивчала динаміку накопичення таксолу у калюсі. Експланти стерилізували 9 %-м розчином гіпохлориту натрію (NaClO) тривалістю опрацювання 60 хв для сегментів пагонів довжиною 1,5-2,0 см, 15 хв – для вегетативних бруньок та очищених від насінної оболонки макрогаметофітів та 4-5 хв – для пиляків і арилусів. Рослинний мате-

ріал поміщали в чашки Петрі діаметром 120 мм на агаризовані живильні середовища SH (Schenk, Hilderbrandt, 1972); MS (Murashige, Skoog, 1962); LP (von Arnold, Eriksson, 1982); B5 (Gamborg et al., 1968); DBM2 – PP (Gresshoff, Doy, 1972) з додаванням інозиту (50 мкМ), нікотинової кислоти (0,8 мкМ), піридоксину-НСІ – В6 (0,5 мкМ), тіаміну-НСІ – В1 (3 мкМ), 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д; 10 мкМ), кінетину (5 мкМ), 3 % сахарози і 0,7 % агару [7]. D. Ewald (2007) як експланти тиса ягідного використовував верхівкові та бічні бруньки, які стерилізувались розчином хлориду (0,25 %) та мийним засобом тривалістю 15 хв, після чого промивали дистильованою водою. Потім експланти пасажували на наступні модифіковані живильні середовища: WPM (Lloyd & McCown, 1981) та L9 (Linsmaier & Skoog, 1965) [9]. A. Zhiri та ін. (1994) досліджували проростання насінних зародків "у пробірці" та отримали 100 % проростання внаслідок промивання експлантів протічною водою протягом семи днів та пророщуванням їх на живильному середовищі Murashige and Skoog чи Heller [10]. Paula P. Chee (1994) проводив культивування зиготних ембріонів насіння на живильних середовищах B5, Litvay та Murashige and Skoog [11]. Z. Abbasin та ін. (2010) як експланти застосовували бруньки та ембріони тиса ягідного. Найкращий ріст експлантів спостережено на середовищі Murashige and Skoog з додаванням 2 мг/л БАП, а укорінення – на половині цього середовища з додаванням 8 мг/л ІОК [8].

Матеріали та методи. Усі дослідження щодо введення в культуру *in vitro* експлантів тиса ягідного здійснено у лабораторії культури тканин кафедри лісових культур і лісової селекції НЛТУ України, для чого застосовано такі матеріали: пінцети, скальпелі, препарувальні голки, чашки Петрі, пробірки (50 мл), колби (1000 мл), рН-метр, кондиціонер, люксметр, апарат для струшування, стерилізатор вертикальний (автоклав), електрофотокалориметр, ламінар 70-БВ, стіл для ламінару, дозатор А-2, термостат TL-80, стерилізатор, повітряний, гідродистилятор, ультрафіолетові лампи.

Отримання асептичної культури є найважливішим моментом, від якого залежить подальший результат розмноження рослин мікроклонуванням. Тому дезінфекції приділяли значну увагу. Стерилізацію посуду та інструментів здійснювали сухим жаром у сушильній шафі за температури 180 °С протягом 1-1,5 год, попередньо загорнувши їх в алюмінієву фольгу. Перед початком садіння експлантатів інструменти знову стерилізували, замочивши їх у 96 %-й етанол та профламбувавши над спиртівкою. Усі роботи проводили у ламінарній кімнаті, яку стерилізували за допомогою бактерицидних ультрафіолетових ламп протягом 1,5-2,0 год [1, 3].

Під час проведення досліджень використано три базових живильні середовища, які найчастіше, за даними літературних джерел, застосовують для мікроклонального розмноження хвойних видів: MS (Murashige and Skoog medium), RW (Risser and White medium), LM (Litvay medium). Середовища були модифіковані з допомогою різних концентрацій та комбінацій фітогормонів: 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота), НОК (α -нафтилоцтова кислота) та БАП (6-бензоламінопурин) (табл. 1). Усі живильні середовища готували за загальноприйнятими методиками, а їх стерилізацію виконували автоклавуванням за температури 120 °С під тиском 0,75-1,0 кг/см² упродовж 20 хв [1-3].

Табл. 1. Модифікації живильних середовищ

Варіант досліджу	Середовище	Застосований фітогормон, мг/л		
		2,4-D	НОК	БАП
1	MS	–	0,1	0,1
2		0,2	–	0,1
3		0,2	0,1	–
4	RW	–	0,1	0,1
5		0,2	–	0,1
6		0,2	0,1	–
7	LM	–	0,1	0,1
8		0,2	–	0,1
9		0,2	0,1	–

Як експланти використовували верхівкові бруньки, заготовлені із середньої частини крони відносно молодих рослин тиса ягідного (4-6 років), розмножених вегетативним способом. У лабораторії проводили стерилізацію заготовленого рослинного матеріалу такими реагентами: протічна вода (H₂O) з детергентом, H₂O₂, C₂H₅OH, NaClO, AgNO₃ різної концентрації та експозиції обробітку. Після кожного хімічного агента експлантати тричі промивали стерильною дистильованою водою (табл. 2).

Табл. 2. Способи стерилізації вихідних експлантів

Варіант досліджу	Застосований реагент (у порядку використання)									
	Вода з милом		H ₂ O ₂		C ₂ H ₅ OH		NaClO		AgNO ₃	
	тривалість, год.	концентрація, %	тривалість, хв.	концентрація, %	тривалість, хв.	концентрація, %	тривалість, хв.	концентрація, %	тривалість, хв.	
1	8	3	5	50	10	10	3	0,1	5	
2	8	6	5	70	10	20	3	0,2	5	
3	8	9	5	96	10	30	3	0,3	5	
4	12	3	10	50	20	10	5	0,1	10	
5	12	6	10	70	20	20	5	0,2	10	
6	12	9	10	96	20	30	5	0,3	10	
7	24	3	15	50	30	10	7	0,1	15	
8	24	6	15	70	30	20	7	0,2	15	
9	24	9	15	96	30	30	7	0,3	15	

Провівши стерилізацію всіх необхідних об'єктів, пасажували приготовлені експланти на живильні середовища та поміщали їх на культивування у штучні умови: 16-годинний фотоперіод інтенсивністю 3 кЛк із температурою 21-23 °С та відносною вологістю повітря 30-35 %.

Результати. У кожному варіанті проведеного досліджу, для достовірності даних, використано по 30 експлантів. Результати стерилізації вихідного рослинного матеріалу були досить варіабельними, що залежало від застосованих хімічних реагентів та їх концентрації (табл. 3).

Дані табл. 3. свідчать, що найбільша кількість заражених експлантів наявна у варіанті досліджу № 1 (100 %), що спричинила низька концентрація усіх застосованих реагентів. У досліджах № 3, 6 та 9 практично всі експланти були некротичними, тобто спалені хімічними агентами високої концентрації. Найкращі результати отримано у варіантах досліджу № 5 та 8-9 та 97 % відпо-

відно асептичних експлантів. Простерилізовані експланти підсаджували на живильне середовище та спостерігали за ними протягом 10 днів. У частини клонів на 7-8-й день спостерігали початок росту, тобто ініціацію. В окремих варіантах досліджень ініціації не було (табл. 4).

Табл. 3. Результати стерилізації експлантів

Варіант досліджу	Кількість експлантів через 12 днів					
	заражені		асептичні		некротичні	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
1	30	100	–	–	–	–
2	18	60	12	40	–	–
3	4	13	3	10	23	77
4	24	80	6	20	–	–
5	1	3	28	93	1	3
6	2	7	1	3	27	90
7	24	80	6	20	–	–
8	–	–	29	97	1	3
9	–	–	3	9	27	90

Табл. 4. Результати введення експлантів в культуру

Варіант досліджу	Кількість пригнічених експлантів		Кількість ініційованих експлантів	
	шт.	%	шт.	%
1	18	60	12	40
2	10	33	21	70
3	16	53	14	47
4	22	73	8	27
5	19	63	11	37
6	21	70	9	30
7	17	57	13	44
8	4	13	26	87
9	11	37	19	64

Отримані результати (див. табл. 4) свідчать, що для введення в культуру *in vitro* експлантів тиса ягідного найбільш придатним виявилось живильне середовище LM, модифіковане фітогормонами 2,4-D (0,2 мг/л) + БАП (0,1 мг/л), де отримали 87 % життєздатних експлантів на 10-й день культивування (рис.).

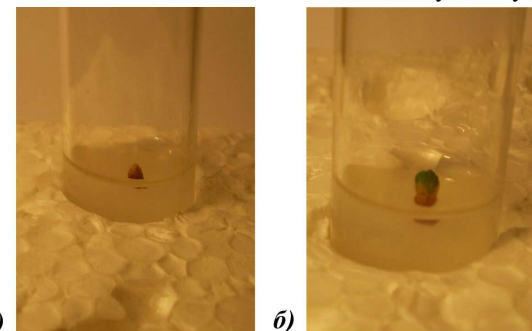


Рис. Експлант тиса ягідного на 10-й день культивування:
а) пригнічений (дослід № 5); б) ініційований (дослід № 8)

Також придатним для мікроклонування досліджуваного виду можна вважати середовище із варіанта досліду № 2 – MS модифіковане такими ж самими фітогормонами: 2,4-D (0,2 мг/л) + (БАП 0,1 мг/л). У разі застосування живильного середовища RW (варіанти досліду № 4-6) отримано найгірші результати ініціації досліджуваних експлантів – 63-73 % пригнічених клонів.

Отже, можна зробити висновок, що для першого етапу мікроклонування тиса ягідного найкраще застосовувати живильні середовища LM або MS, модифіковані з допомогою додавання до них 2,4-D та БАП. Також, очевидно, що застосування як стимулятора НОК у всіх варіантах досліду негативно впливає на цей етап мікроклонування.

Висновки. Результати стерилізації вихідного рослинного матеріалу напряму залежать від концентрації застосованих хімічних реагентів та тривалості експозиції. Найбільший відсоток асептичних експлантів тиса ягідного (97 %) отримали внаслідок їх дезінфекції за такою схемою: протічна вода з милом – 24 год, H₂O₂ (концентрація 6 %) – 15 хв, C₂H₅OH – 30 с, NaClO (концентрація 20 %) – 7 хв, AgNO₃ (концентрація 0,2 %) – 15 с.

Живильні середовища LM або MS, модифіковані фітогормонами 2,4-D (0,2 мг/л) + БАП (0,1 мг/л), забезпечують життєздатність досліджуваних експлантів у 87 та 70 % випадків відповідно.

Література

1. Гожан М.Я. Протокол деконтамінації експлантів культиварів роду *Picea* в умовах *in vitro* / М.Я. Гожан, Р.М/ Гречаник // Проблеми сільського господарства на сучасному етапі та шляхи їх вирішення : матер. наук.-практ. Інтернет-конференції (Україна, м. Миколаїв: 29 жовтня 2012 року). – Миколаїв : Вид-во Миколаїв. ДСДС 133, 2012. – С. 59-61.
2. Гожан М.Я. Особливості реалізації етапу ініціації експлантів культиварів роду *Picea* A. Dietr *in vitro* / М.Я. Гожан, М.М. Гузь, Р.М. Гречаник, М.М. Лісовий // Науковий вісник НЛТУ України : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2014. – Вип. 24.07. – С. 37-42.
3. Калинин Ф.Л. Технология микроклонального размножения растений : монография / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Сарнацкая. – К. : Изд-во "Наук. думка", 1992. – 232 с.
4. Лісовий М.М. Поліморфізм та особливості автовегетативного розмноження *Taxus baccata* L. / М.М. Лісовий // Науковий вісник НЛТУ України : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2014. – Вип. 24.1. – С. 57-63.
5. Лісовий М.М. Автовегетативне розмноження декоративних форм тиса ягідного / М.М. Лісовий // 64-а науково-технічна конференція професорсько-викладацького складу, наукових працівників, докторантів та аспірантів за підсумками наукової діяльності у 2013 році. – Львів : Вид-во НЛТУ України. – 2014. – С. 74-77.
6. Лисовий Н.Н. Размножение некоторых декоративных форм *Taxus baccata* L. черенкованием / Н.Н. Лисовий // Плодоводство, семеноводство, интродукция древесных растений : матер. XVII Междунар. науч. конф. – Красноярск : Изд-во СибГТУ, 2014. – С. 82-84.
7. Філонова Л.Г. Введення в культуру *in vitro* тису ягідного (*Taxus baccata* L.) і отримання таксол-продуруючих калосних ліній : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.22 / Л.Г. Філонова; НАН України. Ін-т клітин. біології і генет. інженерії. – К. : Вид-во "Либідь", 1999. – 19 с.
8. Abbasin Z. *In vitro* Micro-propagation of Yew (*Taxus baccata*) and Production of Plantlets / Z. Abbasin. [Electronic resource]. – Mode of access <http://scialert.net/abstract/?doi=biotech.2010.48.54>.
9. Mohan Jain S. Protocols for Micro-propagation of Woody Trees and Fruits / S. Mohan Jain, H. Häggman. [Electronic resource]. – Mode of access <http://www.springer.com>
10. Springer. [Electronic resource]. – Mode of access <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00035979>
11. Paula P. Chee *In vitro* Culture of Zygotic Embryos of *Taxus* Species / P. Chee Paula. [Electronic resource]. – Mode of access <http://hortsci.ashspublications.org/content/29/6/695.short>

12. Матеріал з Вікіпедії. [Електронний ресурс]. – Доступний з http://uk.wikipedia.org/wiki/Тис_ягідний

13. Червона книга України. [Електронний ресурс]. – Доступний з <http://redbook-ua.org/item/taxus-baccata-l/>

Лисовий Н.Н. Особенности стерилизации и введения в культуру *in vitro* эксплантов *Taxus baccata* L.

Проведен критический анализ и краткий обзор литературных источников, касающихся исследуемой тематики. Подробно описана примененная методика проведенных исследований: исходный растительный материал, который применяли как экспланты при микроклонировании *Taxus baccata* L.; очередность использования химических реагентов, их концентрации и продолжительность обработки при стерилизации; виды и модификации питательных сред. Установлена оптимальная схема деконтаминации исходного растительного материала изучаемого вида, подобраны оптимальный состав среды и комбинации фитогормонов для проведения успешной инициации эксплантов. Обобщены и проанализированы полученные результаты.

Ключевые слова: *Taxus baccata* L., *in vitro*, эксплант, стерилизация, инициация, питательная среда, деконтаминация.

Lisoviy M.M. Features of Sterilization and Introduction to the Culture *in vitro* of Explants of *Taxus Baccata* L.

The critical analysis and a brief review of the literature concerning the studied subjects. Described in detail the methodology of the research applied: the initial plant material used as explants in micropropagation of *Taxus baccata* L.; sequence use of chemical reagents, their concentration and duration of soaking in sterilization; types and modifying nutrient media. An optimal scheme of decontamination initial plant material studied species and found optimal composition environment and phytohormones combination for a successful initiation explants. Summarized and analyzed the results.

Keywords: *Taxus baccata* L., *in vitro*, explants, sterilization, initiation, nutrient medium decontamination.

УДК 630*187

Директор І.Ф. Колядзін, канд. с.-г. наук – ДП "Брошнівське лісове господарство"

ДИНАМІКА СКЛАДУ МІШАНИХ ЯЛИЦЕВИХ ДЕРЕВОСТАНІВ БАСЕЙНУ РІЧОК ЛУКВА І ЛІМНИЦЯ

Простежено динаміку складу мішаних ялицевих деревостанів у 7 масивах вологої буково-смерекової суяличини Передкарпаття протягом 45 років – від 1967 до 2012 р. На місці післявоєнних зрубів утворилися природні двоярусні лісостани у віці 35-50 років з перевагою у складі ялини (60-80 %). Бук, внаслідок надмірного зволоження ґрунтів, знаходиться тільки у підрослі. Після інтенсивних санітарних рубок протягом наступних 30-35 років сформувалися насадження із значною участю, а частіше з перевагою ялиці. Оптимальні за породним складом деревостани 5-6Яц 2-3Ял 1-2Бк +Яв та 6-7Яц 1-2Ял 1-2Бк +Яв можна буде сформувати у подальшому із застосуванням вибіркового рубок або рубок переформування. У таких насадженнях можливе зрідження намету не нижче зімкненості крон 0,7. При цьому треба постійно регулювати склад деревостану, збільшуючи частку участі ялиці бука та явора, одночасно зменшуючи участь ялини.

Ключові слова: ялиця, смереково-буково-ялицеві деревостани, оптимальний склад, Передкарпаття.

Вступ. Рациональне лісокористування передбачає оптимізацію просторової структури лісових біогеоценозів у межах водозбирання. Оптимізація структури має враховувати і виходити із типологічної належності ценозів, тобто