УДК 631.527 : 633.85 : 581.165

Черненко А. Д. [1,2], Небиков М. В. [1]
[1] Національний дендропарк «Софіївка» НАНУ
[2] Уманський національний університет садівництва

СТЕРИЛІЗАЦІЯ ЕКСПЛАНТІВ РІПАКУ ОЗИМОГО ДЛЯ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Наведено результати досліджень з підбору речовини-стерилізатора для проведення ефективної стерилізації стеблових сегментів ріпаку озимого при введенні їх у культуру *in vitro*.

Вступ

Ріпак як олійна культура набув значного поширення протягом останніх років. Зокрема у державах Євросоюзу площі, на яких вирощується ріпак, зросли з 461955 у 2000 році до 8533251 га у 2008 році. В Україні ці показники відповідно становили 156700 та 1379600 га [12]. Проте врожайність ріпаку в нашій державі все ще нижча, ніж у країнах ЄС.

Використання у сільськогосподарському виробництві гібридів F_1 дає змогу значно підвищувати врожайність ріпаку за рахунок явища гетерозису [10]. Однак селекція ріпаку озимого на гетерозис в Україні лише починається [6].

Ріпак — факультативний самозапилювач, ступінь перехресного запилення якого залежно від умов навколишнього середовища становить від 15 до 45 % [14]. Тому для забезпечення 100 % гібридності насіння важливо мати ефективний спосіб запобігання самозапиленню. До відкриття явища чоловічої стерильності цієї мети досягали ручною кастрацією квіток рослин материнської форми на придатних для цього культурах, зокрема кукурудзі. Однак це значно підвищувало собівартість насіння, навіть кукурудзи. Щодо ріпаку, то через особливості цвітіння і будови квіток ручна кастрація може бути використана у цієї рослини тільки з селекційною метою. Відкриття цитоплазматичної чоловічої стерильності значно здешевило процес виробництва насіння, оскільки у гібридизації брав участь стерильний материнський компонент, що виключало необхідність кастрації [8].

Генезалежна чоловіча стерильність ріпаку контролюється взаємодією генів с, які локалізовані у мітохондріях цитоплазми *S* та рецесивних ядерних генів *rf* у гомозиготному стані [7, 11].

Гени, що контролюють прояв генезалежної чоловічої стерильності ріпаку можна отримувати з природних популяцій ріпаку та деяких родичів цієї культури, а також індукувати цю ознаку за допомогою мутагенів [15].

Стерильні аналоги материнських ліній гетерозисних гібридів створюють багаторазовим бекросуванням материнської лінії зі стерильною формою, а батьківські форми (відновлювачі фертильності) — багаторазовим бекросуванням форми-відновлювача фертильності з батьківською формою [2].

Привабливість технології мікроклонального розмноження для гетерозисної селекції ріпаку полягає у можливості вегетативного розмноження материнських чоловічо-стерильних ліній, і зокрема, що особливо цінно, на етапі створювання закріплювачів стерильності, коли іншими способами отримати достатню кількість насіння стерильних форм неможливо.

Стерилізація є ключовим етапом культури in vitro, від якості якої залежить успіх подальшого культивування, що зумовлює актуальність виконаних досліджень.

Матеріали та методи

Дослідження виконували у лабораторії мікроклонального розмноження відділу фізіології, генетики, селекції та біотехнології рослин Національного дендропарку «Софіївка» НАН України.

За експланти для введення в культуру *in vitro* використовували стеблові сегменти ріпаку озимого

сорту Чорний велетень, завдовжки 1–1,5 см, з двома сім'ядольними листками, отримані з пророщеного насіння.

Вивчали ефективність стерилізації водними розчинами хімічних сполук: 1 % нітрат срібла ($AgNO_3$), 0,1 % дихлорид ртуті ($HgCl_2$), 2,5 % гіпохлорид натрію (NaClO) [5, 9]. З метою покращення ефективності стерилізуючих реагентів до розчину кожного з них додавали емульгатор «Твін 80». Після обробки стерилізуючими реагентами експланти тричі промивали дистильованою водою протягом 10–15 хв. [9] та висаджували на безгормональне живильне середовище Мурасіге і Скуга (МС) [13].

Ефективність стерилізації оцінювали на 8 добу після введення у культуру in vitro визначаючи співвідношення стерильних експлантів до їх загальної кількості.

Життєздатність експлантів визначали на 14 добу після введення в культуру як співвідношення стерильних-життєздатних експлантів до їх загальної кількості.

Живильні середовища, матеріали, інструменти та посуд готували згідно загальноприйнятих методик [1, 3, 4].

Експланти ріпаку озимого *in vitro* культивували за температури 25±1 °С, 16-годинному фотоперіоді, освітленості від 3000 лк та відносній вологості повітря 70 %.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати випробування різних стерилізаторів та експозицій стерилізації при введенні в культуру in vitro експлантів ріпаку озимого показали, що найбільш ефективним стерилізатором виявився дихлорид ртуті (табл. 1).

1. Ефективність стерилізації та життєздатність стеблових сегментів ріпаку озимого сорту Чорний велетень залежно від речовини-стерилізатора та експозиції

Стерилізатор	Експозиція, хв	Ефективність стерилізації, %	Життєздатність, %
Гіпохлорид натрію (NaOCl)	5	0	0
	10	34,17	34,29
	15	42,86	17,14
Дихлорид ртуті ($HgCl_2$)	5	71,43	68,57
	10	77,14	65,72
	15	88,57	51,43
Нітрат срібла ($AgNO_3$)	5	57,14	37,14
	10	74,28	34,29
	15	82,86	25,71

Його застосування забезпечило вихід стерильних експлантів від 71,43 % (за 5-хвилинної експозиції) до 88,57 % (за 15-хвилинної експозиції). При цьому кількість експлантів, що залишились життєздатними і почали розвиватися, найбільшою була у варіанті з експозицією стерилізації 5 хв. — 68,57 %, дещо меншою у варіанті з експозицією 10 хв. — 65,72 % і ще меншою (51,43 %) за 15-хвилинної експозиції. Показники ефективності стерилізації мікроживців ріпаку озимого із застосуванням нітрату срібла були досить високими, хоча і поступалися варіантам із застосуванням сулеми на 14,29 %, 2,86 % та 5,71 % відповідно. Однак кількість життєздатних експлантів після стерилізації нітратом срібла становила лише 25,71–37,14 %. Найменш ефективним стерилізатором виявився гіпохлорид натрію (NaOCl). Його застосування при експозиції 10–15 хвилин забезпечило отримання лише 34,17–42,86 % стерильних експлантів, а при експозиції 5 хвилин всі експланти виявились інфікованими. У той же час у кращому варіанті стерилізації гіпохлоридом натрію з 15-хвилинною експозицією кількість стерильних-життєздатних експлантів була найменшою у досліді — 17,14 %.

Висновок

Встановлено, що для стерилізації стеблових сегментів ріпаку озимого сорту Чорний велетень при

введенні в культуру *in vitro* найефективнішим стерилізатором був водний розчин дихлориду ртуті у концентрації 1,0 % за експозиції 5 хв. з додаванням емульгатора «Твин-80».

Перелік посилань

1. *Биотехнология* растений: культура клеток / Пер. с англ. В. И. Негрука; С предисл. Р. Р. Бутенко. — М.: Агропромиздат, 1989. — 280 с.
2. *Гуляєв Г. В., Гужов Ю. Л.* Селекция и семеноводство полевых культур / Г. В. Гуляєв, Ю. Л Гужов. — М.: Агропромиздат, 1987. — 447 с.
3. *Калинин Ф. Л.* Методы культуры тканей в физиологии и биотехнологии растений. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. — К.: Наук. думка, 1980. — 487 с.
4. *Кунах Ф. А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
5. *Опалко О. А., Небиков М. В., Колдар Л. А.* Вдосконалення методики стерилізації мікроживців *Malus niedzwetzkiana* Dieck для культури *in vitro* / О. А. Опалко, М. В. Небиков, Л. А. Колдар // Старовинні парки і ботанічні сади — наукові центри збереження біорізноманіття та охорони історико-культурної спадщини: Матер. Міжнар. наук. конф., присвяченої 210-річчю «Софіївки» (25–28 вересня 2006 р.). — Умань, 2006. — С. 419–422.
6. *Парий Ф. Н.* Гетерозисные гибриды озимого рапса уманской селекции / Парий Ф. Н., Опалко А. И., Черненко А. Д. // Инновационные технологии — в практику сельского хозяйства: материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвящённой 65-летию агрономического факультета: Сборник научных трудов. — Киров: Вятская ГСХА, 2009. — С. 62–67.
7. *Ріпак:* Ботанічна характеристика. Біологічні особливості. Селекція і насінництво. Технологія вирощування. Використання / [В. Д. Гайдаш, М. М. Климчук, М. М. Макар, та ін.]; упоряд. М. М. Макар. — Івано-Франківськ: Сіверсія, 1998. — 223 с.
8. *Селекція* і насінництво сільськогосподарських рослин / [М. Я. Молоцький, С. П. Васильківський, В. І. Князюк, В. А. Власенко.] — К.: Вища освіта, 2006. –463 с.
9. *Сержук О. П.* Вдосконалення методики стерилізації мікроживців представників роду *Crataegus* L. для культури *in vitro* / О. П. Сержук // Зб. наук. праць УДАУ. — 2008. — С. 148–152.
10. *Черненко А. Д.* Напрями та перспективи селекції ріпаку / А. Д. Черненко. // Матеріали всеукраїнської конференції молодих учених. — Умань, 2010. — Ч. 1. — С. 28.
11. *Черненко А. Д.* Новий тип цитоплазматичної чоловічої стерильності / Черненко А. Д. // Матеріали всеукраїнської конференції молодих учених. Сільськогосподарські, біологічні та технічні науки. — Умань, 2010. — Ч. 1. — С. 122.
12. *FAOSTAT* // Food and agriculture organization of the united nations. — Режим доступу http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor
13. *Murashige T.* A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / Murashige T., Skoog F // Physosol. Plant. — 1962. — Vol. 15. — P. 473–497.
14. *Rakousky S.* Transgenic plant products and their introduction into the environment and crop protection systems, a risk assessment // Genomics for biosafety in plant biotechnology / edited by Jan-Peter Nap, Atanas Atanassov, Willem J. Stiekema. — Amsterdam: IOS Press, 2004. — P. 173–184.
15. *Snowdon R.* Oilseed Rape / R. Snowdon, W. Luhs, W. Fried // Genome mapping and molecular breeding in plant. Oilseeds. — Berlin; Heidelberg: Springer, 2007. — P. 55–114.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ЭКСПЛАНТОВ РАПСА ОЗИМОГО ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Небиков М. В. [1], Черненко А. Д. [1,2]
[1] Национальный дендрологический парк «Софиевка» НАН Украины
[2] Уманський национальный университет садоводства

Установлено, что наиболее эффективным стерилизатором при введении озимого рапса сорта Чёрный вэлэтэнь в культуру *in vitro* является 0,1% дихлорид ртути, который, при экспозиции 5 мин., дает возможность получить наивысший показатель жизнеспособности при наилучшей, для данной экспозиции, эффективности стерилизации.

STERILISATION OF WINTER OIL-SEED RAPE EXPLANTS FOR INITIATION *IN VITRO* CULTURE

Nebikov M. V. [1], Chernenko A. D. [1,2]
[1] National dendrological park "Sofiyivka" of NAS of Ukraine
[2] Uman national university of horticulture

In the researches it is established that the most effective sterilizer for initiation *in vitro* culture of winter oilseed rape of variety Chornyj veleten is 0.1% mercury dichloride with 5 min. exposition. This sterilizer makes it possible to get the highest viability index with the best sterilization efficiency for this exposition.