

DOI 10.36074/logos-26.05.2023.033

УДОСКОНАЛЕНИЙ ПРОТОКОЛ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ *PRUNUS DULCIS* (MILL.) D.A.WEBB

ORCID ID: 0000-0002-6470-2744

Шита Оксана Петрівна

здобувач,
лаборант кафедри лісового господарства
Білоцерківський національний аграрний університет

ORCID ID: 0000-0002-7447-5418

Філіпова Лариса Миколаївна

канд. с.-г. наук, доцент,
доцент кафедри землеробства, агрохімії та ґрунтознавства
Білоцерківський національний аграрний університет

ORCID ID: 0000-0002-9314-8033

Мацкевич Вячеслав Вікторович

доктор с.-г. наук, доцент,
доцент кафедри лісового господарства
Білоцерківський національний аграрний університет

УКРАЇНА

Вже понад століття як були розроблені перші методи мікроклонального розмноження (МКР) окремих видів рослин. Сьогодні МКР комерціалізоване по багатьох культурах. Розробка технологічного протоколу потребує певного часу, а сучасний ритм економіки вимагає швидкого реагування лабораторій *in vitro* на попит ринку. Тому актуальними є готові протоколи розмноження по конкретним культурам [1]. Це дозволяє підприємцям уникнути витрат коштів і часу на подібні дослідження. Перспективною культурою для ринку України є Мигдаль солодкий (*Prunus dulcis*) – цінна із господарської точки зору горіхоплідна культура, віднесена ботаніками до кісточкових культур роду Слива (*Prunus*), підродини мигдалеві (*Amygdaloideae*) або сливові (*Prunoideae*), родини розових (*Rosaceae*).

За результатами наших досліджень класичні середовища для горіхоплідних, як наприклад, DKW не є вдалим для мигдалю. Також середовища QL, MS, на яких успішно культивуються представники роду Слива [2], також не є оптимальними для мигдалю, який еволюційно походить із регіонів з ґрунтами, що характеризуються невисоким умістом елементів живлення, зокрема, нітрогену. Натомість мигдаль є типовим кальцієфілом.

Nas M.N.& Read P.E. [3] розробили гіпотезу, що близьким до оптимального є середовище, яке за своїм умістом подібне до умісту сім'ядолей. Згідно з цією гіпотезою розроблено прописи таких середовищ:

- для мигдалю NAM (Nas Almond Medium);
- для фундука NRM (Nas Read Medium).

На основі експериментальних даних нами розроблено протокол, який успішно застосовується під час мікроклонального розмноження

Для МКР пропонується як основне модифіковане середовище NAM (табл. 1) і як «розвантажувальне» раз через 5-7 пасажів модифіковані середовища QL або NRM.

Таблиця 1

Пропис основного та розвантажувального середовищ для МКР мигдалю

Компонент	Уміст в 1 л середовища	
	QL _{mod}	NAM _{mod}
NH ₄ NO ₃	400,00	900,00
KNO ₃	1800,00	250,00
KH ₂ PO ₄	270,00	1550,00
MgSO ₄ ×7H ₂ O	360,00	2050,00
Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	833,80	1050,00
CaCl ₂ ×2H ₂ O	–	45,00
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,800	–
Na ₂ ЕДТА×2H ₂ O	37,30	–
Ferrilene 4.8 Orto-Orto	–	114,63
MnSO ₄ ×4H ₂ O	0,76	6,00
H ₃ BO ₃	6,20	11,00
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8,60	11,0
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025	3,20
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25	0,10
CoCl×6H ₂ O	0,025	–
KJ	0,08	–
ВАР	1.5 введення, 1,0 мультиплікація і 0,3 ризогенез	
ІВА	0,2 введення, 0,3 мультиплікація і 1.5 ризогенез	
Вітамін В ₁	1,00	
Вітамін В ₆	0,60	
Вітамін РР	1,00	
Вітамін С	3,00	
Мезо-інозитол	100,00	
Гліцин	1,00	
Сахароза	30×10 ³	

Особливості приготування маточних розчинів мінеральної частини середовища представлені в таблиці 2. Решта розчинів однокомпонентні і готуються за принципом один міліграм в одному мілілітрі (1:1). Для приготування робочого розчину додаються компоненти за таблицею 3.

Таблиця 2

Приготування маточних розчинів мінеральної частини середовища NAM

Компонент	Кількість	
	мг/л готового середовища	г л в 1 л маточного розчину
Макросолі (1:40)		
1	NH ₄ NO ₃	900
2	KNO ₃	250
3	KH ₂ PO ₄	1550
4	MgSO ₄ ×7H ₂ O	2050
Ca (1:100)		
1	Ca (NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	1050
2	Ca Cl ₂ ×2H ₂ O	45
Мікросолі (1:1000)		
1	H ₃ BO ₃	11.0
2	CuSO ₄ ×5H ₂ O	3.2
3	MnSO ₄ ×H ₂ O	6.0
4	NaMoO ₄ ×2H ₂ O	0.1
5	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	11.0
Хелат заліза		
1	Ferrilene 4.8 Orto-Orto	114,63

Таблиця 3

Використання маточних розчинів для приготування середовища NAM

Компонент	На 1 літр	На 4 літри
Макросолі NAM	25,00	100,00
Мікросолі NAM	1,00	4,00
Кальцій NAM	10,00	40,00
Ferrilene 4.8 Orto-Orto	12,5	50,00
B ₁	0,5	2,0
B ₆	0,3	1,2
Нікотинова кислота (PP)	3,0	12,0
Аскорбінова кислота	1,5	6,0
Гліцин (глутамін)	1,0	4,0
Аденін	0,5	2,0
Кінетин	1,0	4,0
БАП *м/р	0,2/0,1	0,8/0,4
ІОК *м/р	0,25/1,0	1,0/4,0
ІМК *м/р	0,25/0,5	1,0/2,0
Інозитол	0,1 г	0,4 г
Агар	7,0г	28,000г
Цукор	30.000	120,000
рН 5,8-6,0		

* скороченню м/р відповідає мультиплікація/ризогенез

Мультиплікацію проводять з інтервалами не менше 60 діб. Застосування в якості первинних експлантів *in vitro* призводить до розетковості та гіпергідратації регенерантів (рис. 1). За 3-5 пасажу експланти втрачають морфогенетичний потенціал.



Рис. 1. Початкова стадія патології: вкорочення пагону (розетковість) та гіпергідратація

У випадку появи такої патології експланти інколи і патологічні регенеранти переносять на середовище з мінімальним умістом цитокінінів (0,1 мг/л) та зменшеною вдвічі концентрацією мінеральних елементів.

Висновки.

1. Для введення в асептичні умови застосовують одну з двох стратегій:

A. Серед маточних рослин за результатами ПЛР діагностики відокремлюють безвірусні донори первинних експлантів бруньок;

B. Із донорів ізолюють меристемні експланти.

2. Для МКР пропонується як основне модифіковане середовище NAM і як “розвантажувальне” модифіковані середовища QL або NRM.

3. Мультиплікацію проводять з інтервалами не менше 60 діб.

3. Для індукції ризогенезу змінюють цитокинінауксиновий індекс згідно з таблицею 1 у бік переважання ауксинів (за правилом Скуга – Мілера [4]).

4. Адаптацію проводять на субстраті який складається із кокосового волокна та перліту (1:1) в умовах вологої камери.

Список використаних джерел:

- [1] Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А., Філіпова Л. М. (2019) Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій): науково-практичний посібник. Біла Церква, БНАУ. 84 с.
- [2] Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., Голубкова І.М. (2017) Протокол мікроклонального розмноження аличі, сливи, персика та підщепи персика. «Актуальні проблеми озеленення населених місць: освіта, наука, виробництво, мистецтво формування ландшафту» Тези доповідей учасників III Міжнародної науково-практичної конференції. Біла Церква, БНАУ. 2017/5: 141-142.
- [3] Nas, M. N., Read, P. E. (2004). A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Horticulturae*. 101(1-2): 189–200.
- [4] Skoog, F. and Miller, C.O. (1957) Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118-131.