

## МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ БРУСНИЦІ (*VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.)

**Н.О. ЯРЕМКО**, кандидат с.-г. наук

**Т.В. МЕДВЕДСЬКА, К.М. УДОВИЧЕНКО**, кандидати біол. наук

**Т.А. НАТАЛЬЧУК**, кандидат с.-г. наук

**Я.С. ЗАПОЛЬСЬКИЙ**, мол. наук. співробітник

Інститут садівництва (ІС) НААН України, 03027, Київ-27, вул. Садова, 23, e-mail: nadiiayaremko@gmail.com

*Досліджено вплив стерилізуючих агентів та їх концентрацій на ефективність стерилізації та ініціацію експлантів брусниці. Підбрано поживне середовище та концентрацію цитокініну для максимальної проліферації експлантів в умовах in vitro. Доведено можливість одночасного укорінення та адаптації мікропагонів брусниці безпосередньо в умовах ex vitro, що дає можливість заощадити кошти при комерційному вирошуванні рослин.*

**Ключові слова:** брусниця, експланти, стерилізація, розмноження, *in vitro*, *in vivo*, адаптація, цитокінін, 2-іР, WPM, середовище, лізоформін, хлорид ртуті.

Крім традиційних для України ягідних культур, увагу спеціалістів привертають досі малопоширені в культурі рослини, до яких належить і брусниця. Смакові та лікувальні властивості її плодів і листя, здатність рости на заболочених кислих ґрунтах, не придатних для вирощування інших господарсько-цінних рослин, робить брусницю привабливою для промислового та аматорського садівництва.

Брусниця (*Vaccinium vitis-idaea* L.) належить до роду *Vaccinium* родини *Ericaceae* (вересових). Це – вічнозелена карликова (10-28 см) рослина з довгим сланким кореневищем, що складає майже 80 % від її загальної біомаси. Зацвітає на початку червня маленькими світло-рожевими квітками. Ягоди округлі, 7-12 мм у діаметрі, досягають у кінці серпня - на початку вересня, кисловатого смаку (рН 2,5) містять таніни (7-21) і антоціани (1-27 мг/г свіжої маси відповідно) та близько 6 % загальних цукрів. Ягоди брусниці характеризуються високими смаковими та лікувальними властивостями завдяки вмісту аскорбінової кислоти, омега-3 жирних кислот, поліфенолів і антиоксидантів. З плодів і листків було виділено та ідентифіковано понад 116 антоціанових і флавоноїдних компонентів, які характеризуються протизапальною, антибактеріальною, противірусною та протираковою активністю [1]. Насіння брусниці містить 32 % жирної олії, що швидко висихає [2].

Комерційне вирощування брусниці було запроваджено в 1980-х роках у Німеччині, а трохи згодом у США. Будучи гетерозиготною, ця культура не може зберегти генетичні характеристики шляхом розмноження насінням. Ос-

новними способами її розмноження є поділ кореневища та живцювання, котрі є трудомісткими і тривалими. Найбільш вживаним методом розмноження є вкорінення у торфї зелених живців, однак його успішність варіює залежно від клонів і років культивування. Використання технології *in vitro*, як надійного та ефективного методу розмноження, дає можливість подолати недоліки традиційних способів, що важливо для швидкої інтродукції нових культур [3].

Дослідження Debnath і McRae свідчать, що як європейські сорти брусниці (*ssp. vitis-idaea*), так і канадські дикі клони (*ssp. minus*) можна мікророзмножувати з верхівок пагонів і вузлових експлантів на живильному середовищі, яке містить 12,3 мкМ N6-[2-ізопентеніл] аденіну (2-іР) або 5,7 мкМ зеатину. При цьому природний цитокінін зеатин стимулював утворення у два-три рази більшої кількості пагонів у *V. vitis-idaea ssp. vitis-idaea* сорту Регал, ніж 2-іР.

Про вищу ефективність зеатину для ініціації [4] та проліферації пагонів у брусниці повідомляли й інші джерела [5]. Хоча цитокініни відіграють певну роль у проліферації, надмірна їх концентрація призводить до аномальної морфології мікропагонів [6] і посилює соматоклональні варіації в регенованих рослинах, отриманих *in vitro* [7]. Отже, вибір оптимальної їх концентрації для кожного окремого сорту є актуальною проблемою, особливо зважаючи на те, що, згідно з даними попередніх досліджень [8], регенераційна здатність брусниці є високо генотипзалежною.

Проліферація та розмноження пагонів значною мірою залежать від мінерального складу середовищ. Gajdosova et al. [9] повідомили, що сегментація регенованих мікропагонів і подальше культивування у свіжому середовищі підвищували інтенсивність проліферації пагонів. Одним із вирішальних компонентів, які впливають на неї, в культуральному середовищі, є також концентрація і типи вуглеводів [10]. Сахароза та глюкоза краще, ніж сорбіт, індукують це явище. Оптимальна концентрація сахарози для проліферації пагонів становить 10-20 г/л для сортів брусниці *V. vitis-idaea ssp.* [11]. Оскільки ця рослина є ацидофільною, інтенсивність проліферації пагонів залежить від рН середовища. Розмноження пагонів *in vitro* було ефективним у *V. vitis-idaea ssp. minus* при рН 5,0 [12].

Невибаглива вітамінна та корисна брусниця завойовує прихильників, яких з кожним днем стає все більше. Однією з важливих цілей галузі ягідництва є збільшення площ промислового її вирощування для задоволення загального попиту.

**Методика.** Вивчали ранньостиглий, дуже врожайний і невибагливий сорт брусниці Руно білявське, виведений у Польщі [13].

Кущ невеликий, крона в діаметрі до 35 см, плоди великі, округлі, трохи приплюснуті, темно-червоні, з тонкою шкірочкою, починають дозрівати в серпні.

Введення даної рослини в асептичну культуру проводилось у три етапи: перша і третя декади липня (пагони зелені, молоді) і третя серпня (напівздерев'янілі пагони). Як експланти використовували верхівкові та пазушні бруньки. Попередньо їх промивали проточною водою 20 хв. і в комерційному розчині NaOCl (1:5) – 20 хв. Стерилізуючими агентами було використано 0,1 %-й розчин HgCl<sub>2</sub> і 1 і 2 %-й розчин «Лізоформіну 3000». Стерилізували експланти за такою схемою:

- 70 %-й спирт – 30 сек., 0,1 %-й розчин  $\text{HgCl}_2$  – 3, 4 і 5 хв.;
- 70 %-й спирт – 60 сек., 0,1 %-й розчин  $\text{HgCl}_2$  – 3 і 4 хв.;
- 70 %-й спирт – 30 сек., 1 %-й розчин лізоформіну – 5 і 7 хв.;
- 70 %-й спирт – 30 сек., 2 %-й розчин лізоформіну – 3, 5 і 7 хв.

Після стерилізації висаджували на середовище МакКоуна (WPM) з цитокиніном 2-іР у концентрації 3,0-5,0 мг/л (рис. 1). Мікропагони культивували протягом 16-годинного світлового дня з освітленням 2000-2500 лк за температури 23-25 °С та вологості повітря 50-60 %. Усі живильні середовища, використані в дослідях, стерилізували за допомогою автоклавування при температурі 120 °С і тиску 1 атм впродовж 20 хв.

**Результати.** Максимальний вихід стерильних експлантів на рівні 90 % забезпечило використання 2 %-го р-ну лізоформіну в експозиції 7 хв. Дещо менша їх кількість була при експозиції 5 хв. – 80 %. Такий же результат отримали при застосуванні 0,1 %-го розчину  $\text{HgCl}_2$  впродовж 4 хв. і 70 %-го спирту – 30 сек.



Рис. 1. Розвиток експлантів брусниці на середовищі WPM

У процесі досліджень виявилось, що лізоформін, хоч і забезпечував високий вихід стерильних експлантів, дещо пригнічував їх подальший розвиток. Так, після стерилізації лізоформіном регенерувало 42-46 % експлантів, тоді як після використання 0,1 %-го розчину  $\text{HgCl}_2$  – 61-85 %. Максимальна їх кількість регенерувала після застосування для стерилізації 70 %-го спирту – 30 сек. і 0,1 %-го розчину  $\text{HgCl}_2$  – 4 хв. Отже, можемо стверджувати, що такий режим стерилізації є оптимальним для отримання асептичної культури сорту Руно білявське. Наші результати не суперечать даним, одержаним Papřstein F. і Sedlák J., які використовували 0,15 %-й  $\text{HgCl}_2$  для стерилізації експлантів сортів Корал, Ліннеа та Руно білявське і отримали до 90 % регенованих експлантів.

Розвинені мікророслини культивували на трьох різних за мінеральним і гормональним складом середовищах (табл.). Дані, представлені в таблиці,

свідчать, що максимальний приріст мікропагонів отримували на середовищі WPM, що містило 5-6 мг/л цитокініну. Такі концентрації 2-іР при культивуванні бруслиці були оптимальними і в дослідженнях Jaakola et al. [14].

Коефіцієнт розмноження мікропагонів сорту Руно білявське залежно від складу поживного середовища та вмісту цитокініну

Поживне середовище	Концентрація 2-іР			Середнє за складом поживного середовища
	4 мг/л	5 мг/л	6 мг/л	
Андерсона	1,70±0,27	1,73±0,09	1,87±0,03	1,8
Ціммермана-Брума	1,90±0,15	2,00±0,20	1,90±0,12	1,9
МакКоуна	3,27±0,27	3,77±0,07	3,73±0,22	3,6
<i>НІР</i> <sup>05</sup> фактор А (поживне середовище)				0,44
<i>НІР</i> <sup>05</sup> фактор Б (концентрація цитокініну)				0,26
<i>НІР</i> <sup>05</sup> взаємодія факторів АБ				0,26

На середовищах Андерсона та Ціммермана-Брума цей показник був удвічі нижчим. Дослідження показують, що культура *Vaccinium* в умовах *in vitro* віддає перевагу середовищам з низькою концентрацією іонів, таких як Woody Plant Medium [15], що підтверджено також і в нашій роботі. З використанням зеатину в концентрації 2 мг/л для сорту Руно білявське було отримано коефіцієнт розмноження на рівні 8,9 (Paprštein F., Sedlák J.), котрий у 2,5 рази перевищує максимальний показник, одержаний у наших дослідках. Але оскільки цитокінін зеатин дорогий, це призводить до здорожчання кінцевого продукту. До того ж зеатин є термонестабільним, що ускладнює його використання при масовому розмноженні бруслиці, тому для стимулювання пагоноутворення ми застосовували 2-іР (рис. 2).

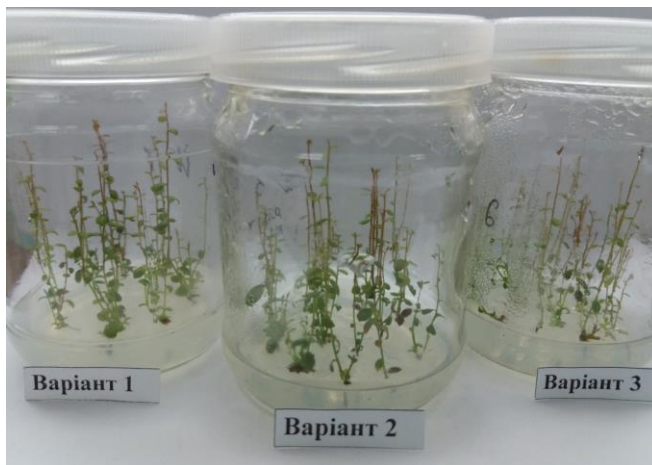


Рис. 2. Рослини бруслиці сорту Руно білявське на середовищі МакКоуна з різними концентраціями 2-іР 4 мг/л (варіант 1), 5 мг/л (варіант 2) і 6 мг/л (варіант 3)

Також нами статистично було встановлено вплив кожного фактора на коефіцієнт розмноження брусниці, а саме: вплив поживного середовища (фактор А) був найбільшим і складав 91,2 %. Незначним був вплив концентрації цитокиніну – 1,4 % (фактор Б) та 1,3 % – взаємодія цих двох факторів. Дія інших факторів (пасаж рослин, умови культивування та інше) складала 6,1 % (рис. 3).

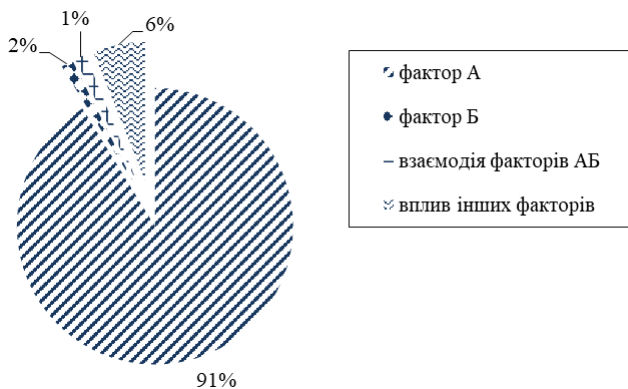


Рис. 3. Вплив факторів досліджень на коефіцієнт розмноження рослин брусниці, %

Розмножені в культурі *in vitro* мікропагони розміром 3-5 см перенесли в кислий торф'яний субстрат Domoflor mix 3 рН 3,5-5,0 для укорінення безпосередньо в умовах *ex vitro* за регулярного поливу та поступового зниження відносної вологості шляхом провітрювання протягом 3-4 тижнів. Пересадка мікропагонів брусниці з умов *in vitro* в умови *ex vitro* була успішною, оскільки відсоток акліматизованих рослин через місяць складав 85-90 (рис. 4).



Рис. 4 Адаптація експлантів брусниці до умов *in vivo*:  
А – через 30 днів; Б – через 60 днів

Отримані таким способом рослини брусниці не відрізнялися за своєю морфологією від рослин розмножених традиційними способами, що спосте-

рігалося також у дослідях інших учених для сорту Sanna [3]. Укорінення регенерантів безпосередньо в умовах *ex vitro* знижує затрати при комерційному виращуванні рослин так само, як і використання дешевшого цитокініну.

**Висновки.** На підставі результатів наших досліджень для ініціювання асептичної культури брусниці рекомендовано використовувати 0,1 %-й розчин  $\text{HgCl}_2$  як стерилізуючий засіб. Для культивування брусниці серед досліджуваних середовищ кращим виявилось WPM з додаванням 2-іP у концентрації 5 мг/л. Адаптація рослин брусниці не потребувала особливих умов і була в межах 90 % акліматизованих рослин. Отже, вперше в Україні відпрацьовано ефективну методику розмноження брусниці сорту Руно білявське, яку можна застосовувати для тиражування в промислових кількостях.

### Список використаної літератури

1. Debnath S.C., Arigundam U. *In vitro* propagation strategies of medicinally important berry crop, lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Agronomy*. 2020. Vol. 10. P. 744. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10050744><https://www.mdpi.com/2073-4395/10/5/744/htm> - B40-agronomy-10-00744.
2. Paprštejn F., Sedláč J. *In vitro* multiplication of lingonberry – Short Communication. *Hort. Sci.* (Prague). 2015. Vol. 42. P. 102-106.
3. Gustavsson B.A., Stanys V. Field performance of ‘Sanna’ Lingonberry derived by micropropagation vs. stem cuttings. *HortScience*. 2000. Vol. 35. № 4. P. 742-744.
4. Reed B.M., Abdelnour-Esquivel A. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience*. 1991. Vol. 26. P. 1320-1322.
5. Ostrolúcka M.G., Libiaková G., Ondrušková E., Gajdošová A. *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis*. 2004. Vol. 676. P. 207-212.
6. George E.F. Plant propagation by tissue culture. Part 2. In Practice. Edington. UK : Exegetics Ltd., 1996.
7. Marcotrigiano M., McGlew S.P. A two-stage micropropagation system for cranberries. *J. Am. SocHortic. Sci.* 1991. Vol. 116. P. 911-916.
8. Debnath S.C., McRae K.B. *In vitro* culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) : the influence of cytokinins and media types on propagation. *Small Fruits Rev.* 2001. Vol. 1. P. 3-19.
9. Gajdošová A., Ostrolúcka M.G., Libiaková G., Ondrušková E. Protocol for micropropagation of *Vaccinium vitis-idaea* L. In *protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. S.M. Jain, H. Häggman (eds.). Berlin-Heidelberg-Germany-New York, Springer, 2007. P. 457-464.
10. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In *Micropropagation* / T. Kozai, P.C. Debergh, R.H. Zimmerman (eds.). Dordrecht. The Netherlands : Springer, 1991. P. 447-469.
11. Debnath S.C. Effects of carbon source and concentration on development of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) shoots cultivated *in vitro* from nodal explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2005. Vol. 41. P. 145-150.

12. Liquid culture for efficient *in vitro* propagation of adventitious shoots in wild *Vaccinium vitis-idaea ssp. minus* (lingonberry) using temporary immersion and stationary bioreactors / U. Arigundam et al. *SciHortic.* 2020. Vol. 264. P. 1091-1099.
13. Pliszka K., Kawecki L. A new selection of lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea L.*) in Poland. In *Problems of rational utilization and reproduction of berry plants in boreal forests on the eve of the 21 century* : Forest institute NASB. Gomel, 2000. P. 197-199.
14. Jaakola L., Tolvanen A., Laine K., Hohtola A. Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. *Plant cell, tissue and organ culture.* 2001. Vol. 66. P. 73-77.
15. Zimmerman R.H., Broome O.C. Blueberry micropropagation. In *Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture applications and feasibility* : Beltsville, MD, USA, April 21-22, 1980. P. 1080.

## **RED BILBERRY (*VACCINIUM VITIS-IDAED L.*) MICROCLONAL REPRODUCTION**

**N.O. YAREMKO, T.V. MEDVEDIEVA, K.M. UDOVYCHENKO,**

**T.A. NATALCHUK, PhDs**

**Y.S. ZAPOLSKYI, Junior Research Worker**

Institute of Horticulture, NAAS of Ukraine, 03027, Kyiv-27, 23, Sadova st.,

e-mail: nadiiyaremko@gmail.com

*The agents and their concentrations (0.1 % HgCl<sub>2</sub> solution and 1 % and 2 % “Lizoformin 3000” solutions) influence on the efficiency and the explants initiation was researched in order to red bilberry cultivate under the conditions. All of them appeared effective for obtaining explants however for the further regeneration the use of the 0.1 % solution was optimum (61-85 % of the regenerated explants depending on the exposition). Such explants amount was maximum when utilizing 70 % of alcohol (30 sec.) and 0.1 % of the HgCl<sub>2</sub> solution (4 min). Three nutritive media were studied for the efficient red bilberry reproduction, namely: Anderson, Zimmerman and Broome and McCown as well as the best concentration was selected which provided the highest reproduction coefficient of the cultivar Runo Bielawskie. For instance, a nutritive medium and concentration were selected for the maximum explants proliferation in the conditions in vitro (the medium WPM with the addition of 2-iP in the concentration 5 mg/l – the reproduction coefficient being 3.8). Besides, the investigated factors effect on the reproduction coefficient was established statistically, the medium composition influence being the greatest one – 91 %. The rest of the factors did not effect this index considerably. The possibility of the simultaneous rooting and adaptation directly under the conditions ex vitro was proved with an effectivity of approximately 90 % that makes it possible to save costs when growing plants commercially. The efficient methods of the cv Runo Bielawskie reproduction were elaborated for the first time in Ukraine. Those methods may be applied for the*

*studied crop drawing in the industrial numbers.*

**Key words:** red bilberry, explants, sterilization, reproduction, *in vitro*, *in vivo*, adaptation, cytokinin, 2-*iP*, WPM, medium, lizoformin, mercury chloride.

Одержано редколегією 03.05.2022

DOI: 10.35205/0558-1125-2022-77-107-111

УДК 635.156: 581.48:582.998.16

## **РЕЖИМ ЗБЕРІГАННЯ НАСІННЄВОГО МАТЕРІАЛУ КАЛІСТЕФУСА КИТАЙСЬКОГО (*CALLISTEPHUS CHINENSIS* (L.) NEES)**

**Л.О. ШЕВЕЛЬ**, кандидат с.-г. наук, старший науковий співробітник

**О.І. РУДНИК-ІВАЩЕНКО**, доктор с.-г. наук, член-кореспондент НААН України  
Інститут садівництва (ІС) НААН України, 03027, Київ-27, вул. Садова, 23, e-mail: rudnik2015@ukr.net

*Висвітлено результати вивчення режиму зберігання насіння калістефуса китайського за різної вологості повітря двох сортів різного походження протягом 36 місяців. Виявлено позитивний вплив на посівні якості зберігання насіння за низьких позитивних температур (+2...+4 °C) (холодильник) та вологості 8,0 і 6,0 %. Трьохрічні дослідження довели перевагу зберігання насіння за вказаних температурах порівняно з лабораторними умовами (у мішкотарі). Визначено сортову залежність цієї господарської ознаки: насінини сорту Княгиня власної селекції відзначилися вищими показниками енергії проростання та лабораторної схожості за всіх режимів, які вивчали, порівняно до сорту німецького походження Бірма, що свідчить про вищий рівень пластичності вітчизняного. Польова схожість насіння підтвердила виявлені закономірності.*  
**Ключові слова:** сорт, енергія проростання, лабораторна схожість, температура, вологість повітря.

Квітково-декоративне рослинництво на разі є підгалуззю аграрного сектору, котра спрямована на розмноження та вирощування насіння та садивного матеріалу цих рослин з метою їх подальшого використання у створенні насаджень різного функціонального призначення.

Завдяки універсальності використання рослин, великій різноманітності забарвлень і форм суцвіть, тривалому цвітінню, невибагливості у вирощуванні та багатом іншим перевагам, значного поширення та популярності в багатьох країнах, у тому числі і в Україні, серед однорічних квіткових культур набув *Callistephus chinensis* (L.) Nees.

Це – декоративно-трав'яниста рослина, що серед однорічних красивоквітучих культур займає провідне місце як при вирощуванні на присадибних ділянках, так і в ландшафтному дизайні [1, 2]. У нашій країні – це найпопуляр-