

УДК 634.8:579.64

Н.І. Теслюк, М.Л. Литвин, Т.В. Гудзенко

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: natalana@onu.edu.ua

ОПТИМІЗАЦІЯ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ПЕРВИННИХ ЕТАПІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ *IN VITRO* ВОЛОСЬКОГО ГОРІХУ

Мета роботи: оптимізація процесів мікроклонального розмноження волоського горіху (*Juglans regia*) *in vitro* шляхом добору складу та консистенції живильного середовища. **Матеріали і методи.** У роботі використовували методи введення ініціальних експлантів в культуру *in vitro* і мікроклонального розмноження. Застосовували ініціальні експланти – частини стебла і бруньки молодих паростків волоського горіху, пророщені міні-тепличним методом з плодів *Juglans regia*. Для введення експлантів *Juglans regia* в культуру *in vitro* використовували живильні середовища Murashige&Skoog (MS) та Driver&Kuniyuki (DKW). Як желювальний агент використано агар (7 г/л – тверде середовище). До напіврідкого середовища додавали 3,5 г/л агару, рідке – без додавання агару. Всі дослідні варіанти середовищ модифікували додаванням фітогормону цитокінінового ряду 6-БАП. Контроль рН середовища здійснювали на рівні 7,1–7,2. Культивували введені у культуру експланти при температурі +25 оС, інтенсивності освітлювання 2500 лк, відносній вологості 56–70% та фотоперіоді 16 годин – день, 8 годин – ніч. На 3-й, 7-й, 11-й день враховували показники приживлюваності, росту та розвитку ініціальних експлантів. **Результати.** Встановлено, що оптимальним живильним середовищем для введення у культуру та культивування волоського горіху в умовах *in vitro* є середовище DKW, на якому спостерігався високий відсоток приживлюваності експлантів (80%), а також прискорене набухання бруньок та їх проліферація. Запропоновано використовувати напіврідкі живильні середовища для введення ініціальних експлантів волоського горіху в культуру *in vitro*. Застосування напіврідкого живильного середовища DKW для первинних етапів введення волоського горіху в культуру *in vitro* сприяло прискоренню процесів мікроклонального розмноження цієї культури на 2 дні і покращенню приживлюваності на 20 % у порівнянні з твердим середовищем. **Висновок.** Рекомендовано застосування напіврідкого живильного середовища DKW для введення у культуру та культивування волоського горіху в умовах *in vitro* для збільшення показників приживлюваності експлантів на 20%, а також прискореній активації бруньок (2 дні) та їх подальшої проліферації.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, волоський горіх, культура *in vitro*, експлант, живильне середовище



Однією з найцінніших культур рослин, що широко використовується у різних промислових напрямках, є волоський горіх (*Juglans regia*). Вчені відмічають: «плоди волоського горіха можуть рости лише на 7% господарських ґрунтів земної кулі, і українські ґрунти, як найкраще, підходять для вирощування цієї рослини» [2].

Горіхове дерево являє собою високоцінну рослину, деревина якої використовується у виготовленні меблів, а плоди у парфумерній, медичній та харчовій промисловості. Однак, при вирощуванні волоського горіха виробники стикаються з низкою проблем вегетативного розмноження. Так, наприклад, нерегулярний, низький рівень вкорінення, та високий рівень загибелі вкорієних рослин при акліматизації – основні причини зазначеної проблеми [8, 9]. Також серед актуальних проблем є проблема високої вартості саджанців. Ціна одного саджанця цієї рослини для вегетативного розмноження варіюється від 10 до 30 євро, не враховуючи елітні сорти [3].

Біотехнологія рослин – найперспективніша ланка аграрної промисловості, що дає змогу вирощувати рослинний матеріал вільний від захворювань, з покращеними ознаками, а також створювати нові цінні сортові культури [3]. Завдяки використанню методик мікроклонального розмноження рослин можна вирішити проблеми вегетативного розмноження волоського горіху і удосконалити технологію вирощування цієї рослини в культурі *in vitro* на території України. Тому, на думку вчених, «найбільш перспективним напрямком є розробка технології клонування *in vitro* волоського горіх» [1].

На сьогоднішній день для ефективного використання методик мікроклонального розмноження волоського горіха актуальним є пошук вирішення низки проблем та складнощів саме на етапах введення в культуру *in vitro*. Під час даного етапу необхідно враховувати багато чинників, у тому числі, правильність вибору донорної рослини та типу ініціального експланту, пори року для відбору, умов культивування, схеми поверхневої стерилізації рослинного матеріалу [10, 11, 13]. Так, наприклад, проблема побуріння середовища – одна з найсерйозніших проблем на етапі введення волоського горіха до культури *in vitro*. Фенолізацією є результат окиснення поліфенолів, що в більшості випадків виділяються з поверхні зрізу експлантів. Іноді, навіть за умови успішного етапу стерилізації ініціальні експланти все одно гинуть протягом перших днів культивування через виділення фенолоподібних речовин, подальше окиснення яких призводить до побуріння середовища та експланту і блокування транспорту поживних речовин у рослинних тканинах, перешкоджають росту клітин [7, 12]. Відомо, що побуріння середовища, фенолізації та подальшої загибелі експлантів можна уникнути завдяки корегуванню складу живильного середовища, частим субкультивуванням ініціальних експлантів волоського горіха на свіжі живильні середовища, обробкою антиоксидантами та інше [12, 14]. Добір та приготування живильного середовища є одним із найвідповідальніших етапів мікроклонального розмноження рослин.

Отже, кожний конкретний етап культивування експлантів та мікроклонів рослин у культурі *in vitro* потребує емпірично підібраних основних чинників



культивування для забезпечення ефективності розмноження [4].

Мета роботи – оптимізація процесів мікроклонального розмноження волоського горіху *in vitro* шляхом добору складу та консистенції живильного середовища.

Матеріали і методи

Як ініціальні експланти для введення в культуру *in vitro* використовували частини стебла і бруньки молодих паростків рослини, пророщених міні-тепличним методом з плодів *Juglans regia* в умовах адаптаційного боксу (рис. 1).



Рис. 1. Молоді паростки *Juglans regia* отримані в умовах адаптаційного боксу

Fig. 1. Young sprouts of *Juglans regia* were obtained in the conditions of an adaptation box

Пророщування молодих паростків, відбір та стерилізацію рослинного матеріалу проводили згідно попередніх розробок [4]. Стерилізацію ініціальних експлантів проводили поетапно витримуванням та промиванням розчинами хінозолу (2г/л), гіпохлориту натрію (3%) та дистильованої стерильної води. Для введення експлантів *Juglans regia* в культуру *in vitro* було використано живильне середовище Murashige&Skoog (MS) та живильне середовище Driver&Kuniyuki (DKW) згідно прописів.

Солі макроелементів та мікроелементів застосовували за прописами: Murashige&Skoog (MS) [5] та Driver&Kuniyuki (DKW) [6].

Як желювальний агент використовували агар (7 г/л), до напіврідкого середовища додавали 3,5 г/л агару. Також, до складу живильних середовищ додавали 20 г/л цукрози.

Всі дослідні варіанти середовищ були модифіковані додаванням 6-БАП – фітогормону цитокінінового ряду. Контроль рН середовища здійснювали на рівні 7,1–7,2 перед початком автоклавування. Стерилізацію живильного середовища здійснювали в автоклаві під тиском 0,5 атмосфер протягом 20 хв.

Культивування введених у культуру експлантів здійснювали в умовах культуральної кімнати при температурі 25 °С, інтенсивності освітлювання 2500 лк, відносній вологості 56–70% та фотоперіоді 16 год – день, 8 год – ніч.

Проводили спостереження за показниками приживлюваності, росту та розвитку ініціальних експлантів. На 3-й, 7-й, 11-й день після введення проводили відбраковування інфікованих експлантів, визначали терміни набухання та проліферації пазушних бруньок і враховували кількість життєздатних ініціальних експлантів.

Результати дослідження та їх обговорення

Оптимізація живильного середовища для первинних етапів культивування волоського горіха in vitro. Було проведено дослід по виявленню кращого живильного середовища для культури волоського горіха *in vitro* (табл.1). В результаті проведених досліджень встановлено, що кращим середовищем по всім дослідним показникам було середовище DKW.

Таблиця 1

Показники введення у культуру ініціальних експлантів *Juglans regia* на твердих середовищах DKW та MS (n= 30)

Table 1

Indicators of introduction into the culture of initial walnut explants on DKW and MS solid media (n= 30)

| Тип середовища | Приживлюваність експлантів, % | | | Набухання бруньок, шт | | | Проліферація, шт | | |
|----------------|-------------------------------|----|----|-----------------------|---|----|--------------------|---|----|
| | Доба культивування | | | Доба культивування | | | Доба культивування | | |
| | 3 | 7 | 11 | 3 | 7 | 11 | 3 | 7 | 11 |
| DKW тверде | 100 | 90 | 80 | 6 | 7 | 12 | 6 | 9 | 12 |
| MS тверде | 70 | 45 | 30 | 6 | 6 | 6 | 3 | 3 | 4 |

Показник приживлюваності ініціальних експлантів *Juglans regia* на середовищі DKW вище, ніж на середовищі MS в 2,7 рази (80 і 30% відповідно) станом на 11-у добу досліджень.

Із рис. 2 видно динаміку приживлюваності експлантів на впродовж 11 діб культивування (рис. 2). Виявлено, що до третьої доби культивування значної різниці між показниками приживлюваності не було, а ось надалі перевага середовища DKW була очевидною.

Візуальні спостереження за розвитком експлантів, культивованих на живильному середовищі DKW виявили менші ознаки виділення фенольних речовин у товщу середовища, некрозу та більші показники приживлюваності, ніж експланти, культивовані на середовищі MS.



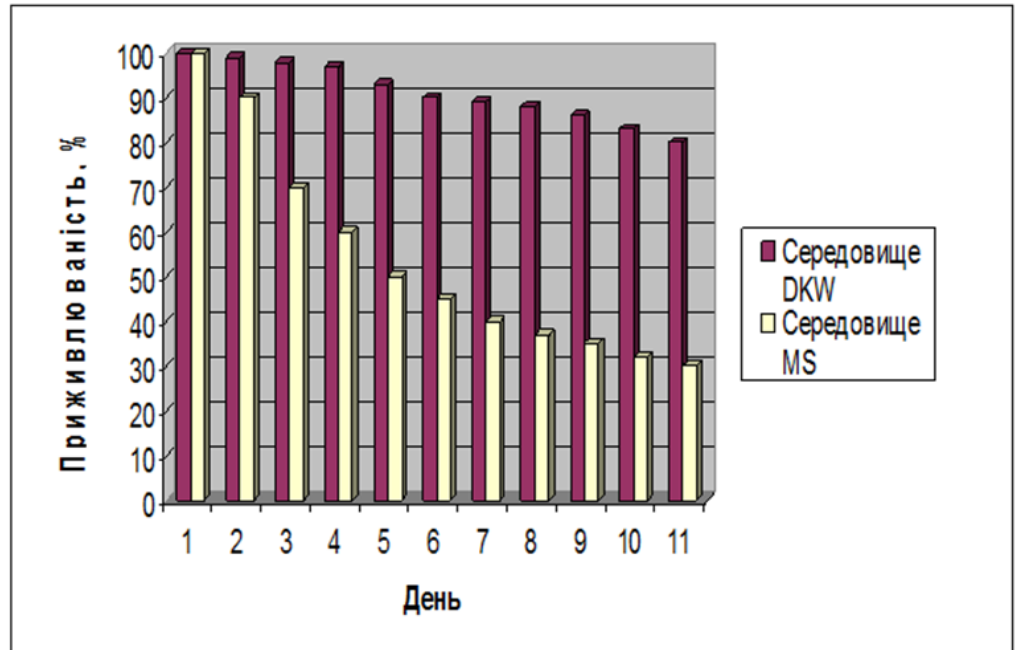


Рис. 2. Показники середньої приживлюваності ініціальних експлантів *Juglans regia* на різних видах живильних середовищ

Fig. 2. Indicators of average engraftment of initial explants of *Juglans regia* on different types of nutrient media

Починаючи з 3-ої доби культивування спостерігали набухання пазушної бруньки у експлантів (рис. 3). Надалі відбувалися процеси проліферації і розвитку пагону.



Рис. 3. Набухання пазушної бруньки *Juglans regia* на 3-й день культивування на середовищі DKW

Fig. 3. Swelling of the axillary bud of *Juglans regia* on the 3rd day of cultivation on DKW medium

Вже на 7-у добу культивування набухання пазухових бруньок було більш активним на середовищі DKW, ініціальні експлати візуально були зеленого кольору, без проявів побуріння як саме експлантів, так і живильного середовища. На 11-у добу від початку культивування вже чітко була помітною краща проліферація пазушних бруньок волоського горіху на середовищі DKW.

З аналізу даних експерименту можемо зробити висновок, що кращим живильним середовищем з обраних для первинних процесів введення культури волоського горіху є середовище DKW.

Наші результати співпадають із думкою К. Payghamzadeh та К. Kerpeneka, які вважають, що середовище DKW є найбільш оптимальним для вирощування *Juglans regia* в культурі *in vitro* [9, 10].

Вплив консистенції середовища на приживлюваність та розвиток експлантів *Juglans regia*. Зазвичай в культурі *in vitro* використовують тверді живильні середовища, виготовлені на основі агару, який являє собою складну суміш поліцукридів, що отримують при переробці червоних та бурих водоростей. Нами було проведено серію експериментів для встановлення впливу консистенції середовища на приживлюваність та розвиток експлантів *Juglans regia*. Запропоновано використовувати напіврідкі живильні середовища для введення ініціальних експлантів волоського горіху в культуру *in vitro*.

Результати досліджень, представлені у таблиці 3 виявили, що напіврідке середовище DKW є кращим для культури волоського горіху. Результати експериментів виявили високу життєздатність ініціальних експлантів горіху, низький відсоток фенолізації та високий відсоток набухання бруньок, а в подальшому проліферації та розвитку пагонів (табл. 2).

Таблиця 2

Порівняльна ефективність різних типів середовища DKW за даними приживлюваності, набухання бруньок та проліферації ініціальних експлантів *Juglans regia*

Table 2

Comparative effectiveness of different types of DKW medium according to survival, bud swelling and proliferation of initial explants *Juglans regia*

| Тип середовища | Кількість введених експлантів, шт | Приживлюваність експлантів, % | | Набухання бруньок, шт | | Проліферація, шт | |
|----------------|-----------------------------------|-------------------------------|----|-----------------------|----|--------------------|----|
| | | Доба культивування | | Доба культивування | | Доба культивування | |
| | | 7 | 11 | 7 | 11 | 7 | 11 |
| DKW тверде | 30 | 90 | 70 | 6 | 12 | 3 | 6 |
| DKW напіврідке | 30 | 95 | 90 | 9 | 16 | 6 | 12 |
| DKW рідке | 30 | 70 | 65 | 3 | 6 | 9 | 9 |

З представлених у таблиці 3 даних видно, що приживлюваність введених експлантів станом на 11-у добу на твердому середовищі DKW склала



70%, а на рідкому – 65%. На напіврідкому середовищі DKW приживлюваність рослинних експлантів склала 90%, що перевищувало відсоток приживлюваності на твердому та рідкому середовищах на 20% та 25%, відповідно (рис.4).

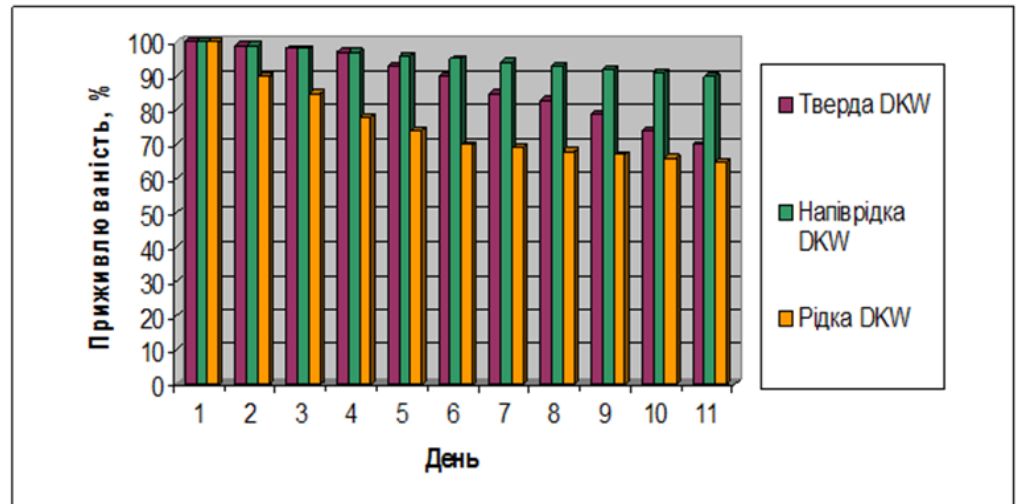


Рис. 4. Приживлюваність ініціальних експлантів *Juglans regia* на середовищі DKW з різними типами консистенції

Fig. 4. Viability of initial explants of *Juglans regia* on DKW medium with different types of consistency

Наступним параметром, за яким оцінювали вплив консистенції середовища була активація ростових процесів рослинних ініціальних експлантів. Приблизно на 3-ю добу після введення, у експлантів розпочиналося пробудження пазухових бруньок (набухання), з 7-ої доби розпочинався розвиток пагонів. Виявлено, що на напіврідкому середовищі набухання та подальша проліферація пазухової бруньки розпочиналася вже на 2-у добу від початку культивування, в той час як на твердому середовищі активація бруньок зафіксована на 3–4 добу культивування. При використанні рідкої консистенції середовища процеси початку проліферації бруньок волоського горіха гальмувалися, що можливо залежало від недостатньої аерації експлантів, занурених в рідину середовища.

Візуальні спостереження показали, що найефективніше процес формування пагонів відбувався на експлантах введених на середовище з напіврідкою консистенцією.

На напіврідкому середовищі експланти швидше формували пагони. Сформовані пагони мали насичений зелений колір та були пересаджені на середовище другого етапу культивування, а саме формування мікроклону та подальшої мультиплікації в культурі *in vitro*.

Оптимальним живильним середовищем для введення у культуру та культивування волоського горіху в умовах *in vitro* було напіврідке DKW, в якому спостерігався високий відсоток приживлюваності експлантів (80%), а також прискорене набухання бруньок та їх проліферація.



Використання напіврідкого живильного середовища DKW для первинних етапів введення волоського горіху в культуру *in vitro* сприяє прискоренню процесів мікроклонального розмноження цієї культури на 2 доби і покращенню приживлюваності на 20% у порівнянні з щільним середовищем.

Таким чином, для введення у культуру та культивування волоського горіху в умовах *in vitro* для збільшення показників приживлюваності експлантів, а також прискореній активації бруньок та їх подальшої проліферації рекомендовано застосування напіврідкого живильного середовища DKW.

N.I. Tesliuk, M.L. Lytvyn, T.V. Hudzenko

Odesa I.I. Mechnykov National University,
2, Dvoryanska St., Odesa, 65082. Ukraine, tel.: +38(048) 746 61 02,
e-mail: natalana@onu.edu.ua

OPTIMIZATION OF THE NUTRIENT MEDIUM FOR THE PRIMARY STAGES OF *JUGLANS REGIA* MICROCLONAL PROPAGATION IN VITRO

Summary

Aim. To optimize the processes of microclonal propagation of *Juglans regia* *in vitro* by selecting the composition and consistency of the nutrient medium. **Methods.** The methods of *in vitro* culture establishment of initial explants and microclonal propagation were used. Parts of the stem and buds of young sprouts, germinated by the mini-greenhouse method from the seeds of *Juglans regia*, were used as initial explants. Murashige&Skoog (MS) and Driver&Kuniyuki (DKW) nutrient media were used to establish *Juglans regia* explants *in vitro*. Agar was used as a gelling agent. The solid, semi-liquid, and liquid media were prepared with addition of 7 g/l, 3.5 g/l and 0 g/l of agar, respectively. All experimental variants of the media were modified by adding the phytohormone of the cytokinin group 6-BAP. The pH of the medium was controlled at the level of 7.1–7.2. The established explants *in vitro* were cultivated at a temperature of + 25°C, a light intensity of 2500 lux, a relative humidity of 56–70% and a photoperiod 16/8 h light/dark. On the 3rd, 7th and 14th day, the survival rate, growth and development parameters of the initial explants were estimated. **Results.** It was found that the optimal nutrient medium for *in vitro* establishment and cultivation of *Juglans regia* is the DKW medium, on which the high survival rate of explants was observed (80%), as well as accelerated swelling of buds and their proliferation. It is proposed to use semi-liquid nutrient media for *in vitro* establishment of initial *Juglans regia* explants. The use of semi-liquid nutrient medium DKW for the initial stages of common walnut micropropagation *in vitro* contributed to the acceleration of the processes of reproduction of this culture by 2 days and improved the survival rate by 20% compared to solid medium. **Conclusion.** The use of semi-liquid nutrient medium DKW for introduction into the culture and cultivation of walnut (*Juglans regia*) *in vitro* is recommended to increase the survival rate of explants by 20%, as well as the accelerated activation of buds (2 days) and their further proliferation.

Key words: microclonal propagation, *Juglans regia*, *in vitro* culture, explant, nutrient medium



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Зарнадзе Н. Ж., Ломтатидзе Н. Д., Зарнадзе Р. Ж. Варшанидзе Н.И., Джапаридзе З.Т. Микрклональное размножение грецкого ореха (*Juglans regia* L.) путем соматического эмбриогенеза // Вісн. Укр. Тов-ва генетиків і селекціонерів.- 2008. – Т. 6, № 1. – С. 60 – 64.
2. Затоковий Ф.Т., Сатіна Л.Ф., Сайко В.І. Основні підсумки досліджень генофонду горіха грецького на Буковині // Садівництво: міжвід. темат. наук. зб. – 2006. – № 58. – С. 46 – 51.
3. Теслюк Н. І., Литвин М. Л. Клональне мікророзмноження *Juglans regia* в культурі *in vitro* // Проблеми та перспективи реалізації та впровадження міждисциплінарних наукових досягнень. – 2021. – С. 66 – 69.
4. Теслюк Н. І., Литвин М. Л. Розробка підготовчого етапу мікрклонального розмноження *Juglans regia* в культурі *in vitro* // Біологічні процеси оптимізації продукційного процесу культурних рослин. – 2021. – С. 39 – 41.
5. Титаренко Т.С., Медведєва Т.В., Сатіна Г.М. Розмноження буковинських сортів горіха грецького (*Juglans regia* L.) // Садівництво. – 2009. – Вип. 62. – С. 22 – 29.
6. Driver J.A., Kuniyuki A.H. In vitro propagation of Paradox Walnutroot stock // Hort. Sci., 1984. – P. 19.
7. Ishtiaq A., Tanveer H., Irfan A., Nafees M., Rafay M., Iqbal M. Lethal Effects of Secondary Metabolites on Plant Tissue Culture // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. – 2013. – №13(4). – P. 539 – 547.
8. Kaur R., Kumar K., Sharma D.R. In vitro germination of walnut (*Juglans regia* L.) embryos // Sci. Hortic, 2006.– P. 109.
9. Kepeneka K., Kolağasib Z. Micropropagation of Walnut (*Juglans regia* L.) // Specialissue of the 2nd International Conference on Computational and Experimental Science and Engineering (ICCESEN 2015). – 2016. – P. 130.
10. Nadra K, Maqsood A, Ishfaq H. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for in vitro shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes // J. Int. Sci. Vigne Vin. – 2015. – №49. – P. 37–45.
11. Navatel JC, Bourrain L. Plant production of walnut *Juglans regia* L. by *in vitro* multiplication // Acta Hort. (ISHS). – 2001. – P. 465–471.
12. Payghamzadeh K, Kazemitabar SK. In vitro propagation of walnut // African Journal of Biotechnology. – 2011. – № 2. – P. 290 – 311.
13. Saadat YA, Hennerty MJ. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.) // Scientia Horticulturae. – 2002. – Vol. 95, №3. – P. 251 – 260.
14. Taghizadeh M, Ganji Dastjerdi, Mahboubeh. Inhibition of browning problem during the callogenesis of *Spartium junceum* L. // Ornamental Horticulture. – 2021. - 27. 68-77. 10.1590/2447-536x.v27i1.2230.



REFERENCES

1. Zarnadze NZh, Lomtatydze ND, Zarnadze RZh, Varshanidze NI, Dzhaparidze ZT. Microclonal propagation of the *Juglans regia* L. through somatic embryogenesis. *Visn. Ukraine Society of Geneticists and Breeders*. 2008; 6 (1): 60–64. [in Russian].
2. Zatokovyi FT, Satina LF, Saiko VI. Osnovni pidsumky doslidzhen henofondu horikha hretskoho na Bukovyni. *Sadivnytstvo: mizhvid. temat. nauk*. 2006; 58: 46–51. [in Ukrainian].
3. Tesliuk NI, Lytvyn ML. Klonalne mikrorozmnozhennia *Juglans regia* v kulturi in vitro. *Problemy ta perspektyvy realizatsii ta vprovadzhen mizhdystsyplynarnykh naukovykh dosiahnen*. 2021; 66–69. [in Ukrainian].
4. Tesliuk NI, Lytvyn ML. Rozrobka pidhotovchoho etapu mikroklonalnoho rozmnozhennia *Juglans regia* v kulturi in vitro. *Biolohichni protsesy optymizatsii produktsiinoho protsesu kulturnykh roslyn*. 2021; 39–41. [in Ukrainian].
5. Titarenko TIe, Medvedieva TV, Satina HM. Rozmnozhennia bukovynskykh sortiv horikha hretskoho (*Juglans regia* L.) 2009; 6: 22–29. [in Ukrainian].
6. Driver JA, Kuniyuki AH. In vitro propagati on of Paradox Walnutroot stock. *Hort. Sci.*, 1984; 19.
7. Ishtiaq A, Tanveer H, Irfan A, Nafees M, Rafay M, Iqbal M. Lethal Effects of Secondary Metabolites on Plant Tissue Culture. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*. 2013; 13(4): 539–547.
8. Kaur R, Kumar K, Sharma DR. *In vitro* germination of walnut (*Juglans regia* L.) embryos. *Sci. Hortic*, 2006; 109 p.
9. Kepeneka K, Kolagasib Z. Micropropagati on of Walnut (*Juglans regia* L.) Specialissue of the 2nd International Conference on Computational and Experimental Science and Engineering (ICCESEN 2015). 2016; 130.
10. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for in vitro shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. *J. Int. Sci. Vigne Vin*. 2015; (49): 37–45.
11. Navatel JC, Bourrain L. Plant production of walnut *Juglans regia* L. by *in vitro* multiplication. *Acta Hort. (ISHS)*. 2001; 465–471.
12. Payghamzadeh K, Kazemitabar SK. In vitro propagation of walnut. *African Journal of Biotechnology*. 2011; (2): 290–311.
13. Saadat YA, Hennerty MJ. Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Horticulturae*. 2002; 95 (3): 251–260.
14. Taghizadeh M, Ganji Dastjerdi, Mahboubeh. Inhibition of browning problem during the callogenesis of *Spartium junceum* L. *Ornamental Horticulture*. 2021; 27. 68–77. 10.1590/2447-536x.v27i1.2230

Стаття надійшла до редакції 07.10.2022 р.

