

ІНСТИТУТ САДІВНИЦТВА
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

Затверджено вченою радою

ІС НААН України

«6» листопада 2019 р

Програма наукових досліджень
аспірантської роботи за темою:

**«Ефективність способів вегетативного розмноження обліпихи
крушиновидної (*Hirpocae rhamnoides*) у Правобережному Лісостепу
України»**

(Індивідуальний план наукової роботи)

Виконав:

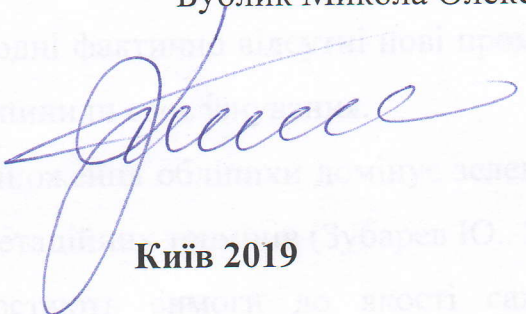
аспірант

Євпак Катерина Євгенівна

Науковий керівник:

доктор с.-г. наук, професор

Бублик Микола Олександрович


Київ 2019

ВСТУП

Обліпіха є цінною плодовою і лікарською рослиною, культура якої набула світового значення. Культурний ареал обліпіхи поширився на країни Європи, Східної та Південної Азії, Північної і Південної Америки (Шалпыков К., 2011). Найбільший попит обліпіхи має в Японії, Південній Кореї та Сінгапурі. Вона поки порівняно мало поширена в українських садах, але заслуговує на увагу вітчизняного агробізнесу, оскільки попит на цю ягоду зростає. Популярності обліпіхи сприяють лікувальні властивості та високі харчові переваги мультівітамінних плодів, зокрема наявність понад 190 біологічно активних речовин. Обліпіху використовують при рекультивації земель, для захисту ґрунтів від ерозії, закріплення рухомих пісків і ярів. Найбільш активно селекційні роботи стосовно даної культури ведуться в Росії, Німеччині та Канаді. Відомі українські сорти обліпіхи: «Солодка жінка» (Інститут садівництва), «Київський Янтар», «Либідь», «Єва» (Дмитрієв В.І.). Попит на ягоду обліпіхи породжує попит на садивний матеріал, оскільки площа плодоносних насаджень культурних сортів даної ягоди в Україні відносно мала.

Культивування обліпіхи в промислових масштабах проводилось в Україні з 1988 року, але було призупинено в наслідок кризових явищ. Відповідно було призупинено і виробництво садивного матеріалу через відсутність попиту. Сьогодні фактично відсутні нові промислові насадження обліпіхи, а старі вже припинили своє існування.

Серед методів розмноження обліпіхи домінує зелене живцювання, що прив'язане до певних вегетаційних термінів (Зубарев Ю., 2013; Миколайко І., 2013). На сьогодні зростають вимоги до якості садивного матеріалу. Насамперед попит при обмежених матеріальних і трудових ресурсах вимагає пошуку нових технологічних підходів до виробництва саджанців, оптимізації витрат, зниження собівартості продукції (Белов, 1986; Тарасенко, 1991; Schroeder, 2017). Один з напрямків вирішення зазначеної проблеми –

розробка альтернативного методу розмноження обліпихи мікроживцями, що дозволить скоротити площу та зменшити витрату трудових ресурсів. В той же час при такій технології виникає ряд додаткових питань, перш за все, необхідність інтенсифікації ростових процесів висаджених мікроживців. Метод мікроклонального розмноження обліпихи наразі не є поширеним, оскільки є технологічно не довершеним і потребує модифікацій під нові сорти (Yao, 1995; Saikia, 2014). Від складу живильного середовища в значній мірі залежить успіх вирощування рослинних тканин. Тому розробці і вдосконаленню складу середовищ приділялося і приділяється багато уваги (Trigiano, 2000).

Наукова проблематика у розмноженні обліпихи крушиновидної відомими способами дає можливість стверджувати про те, що на сьогоднішній день перед науковцями все більше постає питань ніж відповідей. Незважаючи на те, що останнім часом у наукових виданнях інститутів, університетів невпинно з'являються нові позитивні результати, практика свідчить про недоопрацювання технологічних моментів які негативно впливають на кінцевий результат, а саме погана приживлюваність матеріалу, адаптація, а у зв'язку з цим і низький вихід садивного матеріалу обліпихи.

Мета: удосконалити та розробити способи розмноження обліпихи крушиновидної (традиційні, мікроживцювання, культура тканин) та на основі їх господарсько-біологічної оцінки рекомендувати для використання у виробництві.

Об'єкт дослідження: обліпиха крушиновидна сортів Солодка жінка, Київський Янтар, Либідь, Єва, Адам.

Предмет дослідження: технології розмноження – мікроживцювання, зелене живцювання, клональне мікророзмноження у культурі *in vitro*.

У даній роботі передбачається вирішити наступні завдання:

1. Дослідити сортові особливості вкорінення та росту живців обліпихи;
2. Підібрати ефективні методи отримання стерильної культури експлантів обліпихи в умовах *in vitro* ;
3. Підібрати оптимальний склад живильного середовища для мікроклонального розмноження обліпихи та оптимальні умови для адаптації обліпихи після розмноження в культурі *in vitro*;
4. Встановити оптимальні строки живцювання обліпихи впродовж вегетації;
5. Порівняти ефективність вкорінення зелених та здерев'янілих живців у закритому та відкритому ґрунті;
6. Розробити та дослідити технологію мікроживцювання;
7. Розрахувати економічну ефективність технологій розмноження садивного матеріалу обліпихи крушиновидної.

Новизною дослідження даної роботи є проведення комплексних досліджень технологій розмноження обліпихи для групи перспективних сортів, що включають використання традиційних методів (живцювання) та методу культури тканин, які визначають вплив стимуляторів росту, строків живцювання, сортових особливостей живців; вперше буде розроблена технологія мікроживцювання, що дозволить мінімізувати витрату ресурсів при виробництві садивного матеріалу, за умови збереження якості.

Практична цінність роботи: розробка технології мікроживцювання сприятиме отриманню садивного матеріалу високої якості, збільшення відсотку вкорінених рослин та кількості вироблених рослин шляхом подовження терміну живцювання. Дослідження морфогенезу в культурі *in vitro* та модифікація складу поживного середовища дозволить використовувати дану технологію для оздоровлення і розмноження, отримання здорового маточного матеріалу категорії «вихідний» згідно статті 15 Закону України «Про насіння і садивний матеріал» та стандартів ЕРРО.

Висновки проведених досліджень дадуть змогу сформувати рекомендації розсадникам для покращення якості садивного матеріалу обліпихи, прищвидшеному розмноженню.

Дослід 1.Отримання стерильної культури обліпихи в умовах *invitro*.

Перед стерилізацією експланти звільняли від залишків землі, ретельно промивають у теплій проточній воді з милом, споліскували дистиллятом. Така підготовка значно знижує контамінацію поверхневих тканин (Кушнір, 2005). Як стерилізуючий агент використовували: 70% етанол (10с) (Кушнір, 2005), Лізоформін (містить у собі гліюксаль (7,5 %), глутаровий альдегід (9,5 %) і дидецилдиметиламонія хлорид (9,6 %)) в концентрації 1%, 1,5%, розчин гіпохлориту ртуті 0,1. Експланти звільняли від залишків почорнілого листа.

Реагенти: сулема 0,1%, лізоформін 1%; 1,5%.

Часові проміжки стерилізації: 2,5 хв, 3 хв, 3,5 хв.

На етапі введення в культуру та проліферації застосовують середовище Мурасіге-Скуга (MS) (Murashige, 1962), що містило 0,1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ІМК, 0,1 мг/л гібереліну та 2 мг/л гліцину, 6 г/л агару. рН середовища становило 6. Асептичні умови створюють за методами загальноприйнятими в біотехнології. Середовище стерилізують автоклавуванням при температурі 1200С і тиску 1 атм на протязі 20 хвилин. Експланти культивують за 16-годинного світлового дня з інтенсивністю освітлення 2000 -2500 лк, температурою 20-22°С і вологістю повітря 50-60%. У процесі культивування частин стебла здійснюють візуальний аналіз морфогенезу і регенераційної здатності. Інфіковані та некротизовані експланти відбраковують, а життєздатні - пересаджували на живильне середовище для розмноження.

Дослід 2. Розмноженн обліпихи крушиновидної в культурі *in vitro*.

Варіанти середовищ: MS, WPM, MS+WPM (двохфазні).

	Базове середовище	Доповнення
Контроль 1	MS	+ 0.5мг/л BAP
Контроль 2	WPM	+ 0.5 мг/л BAP
Варіант 1.	MS	+BAP 0,1мг/л + PVP 100 мг/л
Варіант 2.	MS	+ BAP 0,1 мг/л + Kn 5мг/л + PVP 100 мг/л
Варіант 3.	WPM	+BAP0,1мг/л + PVP 100 мг/л
Варіант 4.	WPM	+ BAP0,1мг/л + Kn 5 мг/л + PVP 100 мг/л
Варіант 5.	MS	WPM - в якості верхньої рідкої фази
Варіант 6.	WPM	MS - в якості верхньої рідкої фази

Сорти: Київський Янтарь, Либідь, Єва, Адам, Солодка жінка.

У варіанті по 20 експлантів, 3 повторення.

Дослід 3. Строки живцювання обліпихи (використання зелених та здерев'янілих живців).

Варіанти:

- заготівля живців у листопаді, зимове зберігання, висадка в квітні;
- заготівля живців у лютому-березні, висадка в квітні;
- живцювання у третій декаді червня, першій декаді липня, другій декаді липня, третій декаді липня (у фазу інтенсивного росту пагонів);
- першій декаді серпня (у фазу затухаючого росту пагонів).

Дослід 4. Вплив обробки живців стимуляторами росту рослин на укорінення живців.

Умови: - здерев'янілі живці висаджуються у відкритий ґрунт (шкілка) + плівкові накриття;

Зелені живці культивуються у закритому ґрунті (ящики з субстратом) + штучний туман.

Субстрат: торф:перліт:пісок – 2:1:1.

Здерев'янілі живці	Контроль 1: без обробки стимуляторами
	Контроль 2: + ІМК в концентрації 0,015%. Експозиція 18 год

Зелені живці	ІМК в концентрації 0,1%. Експозиція 2 год
	Мегафол
	Radifarm
	Гілея
	Клонекс
	Контроль 1: без обробки стимуляторами
	Контроль 2: + ІМК в концентрації 0,015%. Експозиція 18 год
	Мегафол
	Radifarm
	Гілея
	Клонекс

У варіанті по 30 живців, 4 повторення.

Сорти: Київський Янтарь, Либідь, Єва, Адам, Солодка жінка.

Дослід 5. Підготовка рослин до умов мікроживцювання.

- Акліматизація вкорінених рослин до тепличних умов;
- Мікроживцювання з використанням апікальних меристем зелених пагонів обліпихи.

В якості субстрату використання сумішей торфу (рН 5,7), перліту та піску у співвідношеннях 2:1:1, 2:1:2 та 1:1:1.

Стимулятори росту: комерційні препарати «Гілея», «Megafol», «Radifarm».

Обліки і спостереження:

1. Агрохімічна характеристика ґрунту дослідної ділянки та вміст рухомих форм NPK.
2. Вологість ґрунту в шарах 0-20 см, 20-40 см, 40-60 см визначається через кожні 10 днів протягом вегетаційного періоду у відсотках від маси абсолютно сухого ґрунту, гравіметричним методом.
3. Вміст нітратного азоту визначали за методом Гранваль-Ляжу; рухомі сполуки фосфору і калію за методом Чирикова в порах ґрунту 0-20 см, 20-40 см, 40-60 см.
4. Початок масового коренеутворення.

5. Відсоток вкорінених живців.
6. Кількість коренів та їх загальна довжина.
7. Перезимівля вкорінених живців.
8. Жаро- та посухостійкість саджанців методом В.К. Смикова, а морозостійкість – польовим методом і методами диференційного термічного аналізу льодоутворення (ДТА) та прямого проморожування в термокамерах за методикою М.О. Соловйової в модифікації В.В. Грохольського.
9. Початок відростання живців на дорощуванні.
10. Динаміка росту саджанців.
11. Галуження саджанців.
12. Довжина пагонів саджанців.
13. Розмір листової поверхні саджанців.
14. Діаметр умовної кореневої шийки саджанців.
15. Ступінь визрівання пагонів.
16. Кількість коренів, їх довжина та маса.
17. Вихід саджанців за товарними сортами.
18. Економічна оцінка та ефективність вирощування саджанців за методикою О.М. Шестопаля.
19. Статистичний аналіз результатів досліджень – за Б.А. Доспеховим.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРА

1. Gupta RK, Singh V. Studies on micropropagation in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). In: Singh V (ed) Seabuckthorn (*Hippophae* L.): a multipurpose wonder plant, 2003.
2. JMS Chauhan., et al. "In-vitro Propagation of Himalyan *Hippophae salicifolia* Through Nodal Segments". *Acta Scientific Agriculture* 3.4 (2019): 314-318.
3. Kauppinen S., Petruneva E. Producing Sea Buckthorn of High Quality. Proceedings of the 3rd European Workshop on Sea Buckthorn. 2015. – 98 p.
4. MONTPETIT D., M. LALONDE. Invitro propagation and subsequent nodulation of the actinorhizal *Hippophae rhamnoides* L. - Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15, (1988). - 189-199.
5. Murashige T, Skoog FA, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962; 15: 377–383.
6. Plant Development And Biotechnology (2005). Edited by Trigiano, R. N., Gray, D. J. CRC Press LLC.
7. Rajchal, Rajesh. "Seabuckthorn (*Hippophae salicifolia*) Management Guide." Rufford.org. The Rufford Small Grants for Nature Conservation, 2009. Web. November 15, 2014
8. Scherwinski, P.J.E., Lima, E.C.A., da Silva, T.L., Mesquita, A.G.G, Maciel, S.A., et al. (2011). Double-phase culture system for large scale production of pineapple. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 109, pp. 263-269.
9. Schroeder, W.R. 2017. Seabuckthorn Propagation. Agriculture and Agri-Food Canada, Indian Head, Saskatchewan, Canada.
10. Singh V, Gupta RK. Micropropagation of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). In: Singh V (ed) Seabuckthorn (*Hippophae* L.) a multipurpose wonder plant. - Advances in research and development. Daya Publishing House, Delhi, 2008; 3: 3–13.

11. Teisson, C., Alvard, D., Lartaud, M., Etienne, H., Berthouly, M., Escalona, M., Lorenzo, J.C. (1999). Temporary immersion for plant tissue culture. In: Plant Biotechnology and *In vitro* Biology in the 21st Century, Proceedings of the IXth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Section H: Novel micropropagation methods, pp. 629-632.
12. Thomas S.C. Li, Schroeder W.R. Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) a multipurpose plant / Thomas S.C. Li, Schroeder W.R. / HortTechnology 6(4)., 1996. – 370-380.
13. Thorpe, T. (2007). History of plant tissue culture. Molecular Biotechnology, 37, pp. 169-180.
14. Trigiano R.N. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises / R.N. Trigiano, D.J. Gray. - US / MA, CRC Press LLC., 1999-2000. - 454 p.
15. Аладина О.Н. Применениелингогуматов в технологии зеленого черенкования крыжовника / О.Н. Аладина, С.В. Акимова // Докл. ТСХА. – М.: 2004. – Вып. 276. – С. 386-388.
16. Белов В.Ф. Питомниководство ягодных культур. М.: Россельхозиздат, 1985. - С. 152.
17. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологий на их основе / Р.Г. Бутенко // М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
18. Высоский В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: Автореф. дисер. Д. с.-х. наук. М, 1998. – 44 с.
19. Ермаков Б.С., Фаустов В.В. Технология выращивания облепихи. – М.: «Россельхозиздат», 1983. - 64 с.
20. Меженський В. М., Меженська Л. О., Якубенко Б. Є. Нетрадиційні ягідні культури: рекомендації з селекції та розмноження. – К. : ЦП «Компринт», 2014. – 119, [12] с.
21. Миколайко І. І. Ризогенетична здатність зелених стеблових живців сортів обліпихи крушиновидної (*Hippophae rhamnoides* L.) залежно від

- впливу біологічно активних речовин / І. І. Миколайко // Агробіологія. - 2013. - Вип. 10. - С. 111-117.
22. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. — К.: Наукова думка, 1976.- 335 с.
23. Радкевич Д.Б. Технология производства посадочного материала облепихи крушиновидной с закрытой корневой системой / Д.Б. Радкевич, М.С. Шалкевич, В.А. Самусь // Плодоводство : науч. тр. / Ин-ут плодоводства НАН Беларуси. — Самохваловичи, 2011. — Т. 23. — С.247-257.
24. Соловьева М.А. Методы определения зимостойкости плодовых культур: методическое пособие. — Л., 1982. — С. 26-31.
25. Тарасенко М.Т. Зеленое черенкование садовых и лесных культур / М.Т. Тарасенко. —М. : Изд-во ТСХА, 1991. — 272 с.
26. Учеты, наблюдения, анализы, обработка данных в опытах с плодовыми и ягодными растениями: методические рекомендации / Под. ред. Г.К. карпенчука, А.В. Мельника// Умань: Уманьс-хин-т, 1987. — 115 с.
27. Кошелев Ю.А., Агеева Л.Д. Облепиха: Монография. — Бийск, 2004. — 320 с.
28. Гриник І.В. Перспективи вирощування малопоширених плодово-ягідних культур в сучасному садівництві // Гриник І.В., Москалець Т.З., Москалець В.В. Зб. мат. Першої Всеук. наук.-практ. конференції «Досягнення та концептуальні напрями вирощування малопоширених плодово-ягідних культур та переробки їх сировини», Київ: Інститут садівництва НААН, Видавництво Центр учбової літератури, 2018, С. 6-9.
- 29.