

ПРОТОКОЛ ДЕКОНТАМІНАЦІЇ ЕКСПЛАНТІВ *PINUS SYLVESTRIS* L. В КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

Lisovyi M.M., Ivaniuk A.P.

PROTOCOL FOR DECONTAMINATION OF *PINUS SYLVESTRIS* L. EXPLANTS *IN VITRO*

Проведено дослідження впливу концентрації хімічних стерилізуючих агентів і тривалості їх експозиції на якість стерилізації вихідних експлантів досліджуваного виду. Описано методику експериментів, спрямованих на отримання асептичної культури експлантів сосни звичайної (*Pinus sylvestris* L.) для подальшого культивування *in vitro*.

Ключові слова: експлант, стериліант, концентрація, розмноження.

Сосна звичайна є одним із ключових лісотвірних видів нашої країни. Вона здатна створювати деревостани у борах, суборах та сугрудках. Деревина цього виду має широке застосування як будівельний матеріал і сировина для паперово-целюлозної промисловості. Окремо варто підкреслити значний генетичний поліморфізм сосни звичайної, що робить її перспективним вибором для озеленення населених пунктів (Лісовий, 2013). Така господарська цінність *Pinus sylvestris* L. і формує потребу у освоєнні нових, сучасних та ефективних способів розмноження, до яких варто віднести мікроклонування.

Отримання асептичної культури експлантів є ключовою початковою стадією в процесі мікроклонування рослин, яка забезпечує основу для успішного виконання наступних етапів. Головним завданням на етапі деконтамінації є очищення досліджуваного рослинного матеріалу (експлантів) від шкідливих патогенів. З цією метою застосовуються спеціальні хімічні реагенти (хіміотерапія) (Мельничук, 2003; Лісовий, 2016).

Потрібно зазначити, що у літературних даних немає описаної однозначної методики розмноження досліджуваного виду мікроклонуванням. Так у праці Шлапака В. В. та Небикова М. В. (2011) описано перспективи розмноження в умовах *in vitro* рослин сосни звичайної із використанням як експланти насіння молодих особин (25-30 років). Найкращі показники деконтамінації такого рослинного матеріалу забезпечував його обробіток 0,1 %-м водним розчином дихлориду ртуті протягом 1 хвилини. Дослідження проведені Andersone U. (2002) стосувались впливу періоду заготівлі і зберігання бруньок, як матеріалу для формування вихідних експлантів, на проходження морфогенезу в умовах *in vitro*. Низкою вчених (Niemi K. та ін., 2002) як експланти було використано насіння, яке піддавали попередній стерилізації 2 %-м гіпохлоридом кальцію протягом 20 хвилин із наступним промиванням дистильованою водою.

Дослідження щодо деконтамінації експлантів *Pinus sylvestris* L. проводили

в лабораторії культури тканин кафедри лісових культур і лісової селекції НЛТУ України. Робота здійснювалася за стандартними методиками (Мусієнко, 2005) та доповненими їх модифікаціями (Лісовий, 2016). Бічні та верхівкові вегетативні бруньки досліджуваного виду слугували експлантами для проведення роботи. Усі етапи виконувалися в асептичних умовах. У ході дослідження використовували ступінчасту схему стерилізації, яка передбачала послідовну обробку експлантів різними агентами з використанням різних концентрацій та їх комбінацій (табл. 1).

Таблиця 1

Використані речовини для деконтамінації вихідних експлантів

№ з/п	Стерилізуючий агент	Концентрація	Експозиція
1	протічна H_2O + детергент + "Твін 80"	10 + 5 г/л	2, 4, 6 годин
2	H_2O_2	1; 2; 3 %	3; 5; 10 хвилин
3	$C_2H_5OH^*$	50; 70; 96 %	5; 10; 15 секунд
4	$NaClO$	10; 20; 30 %	3; 5; 7 хвилин
5	$AgNO_3$	0,1; 0,2; 0,3 %	5; 10; 15 хвилин
6	$HgCl_2$	1; 2; 3 %	5; 10; 15 хвилин

* Примітка: усі варіанти досліду були проведені із першочерговим обробитком експлантів етанолом, з метою видалення смоляного нальоту.

Стерилізований рослинний матеріал переносили на живильне середовище MS (Murashige and Skoog) без додавання стимуляторів росту і спостерігали за його розвитком протягом 10-15 діб. Виходячи з отриманих даних, проводили оцінку наступних параметрів стерилізації.

➤ Ефективність стерилізації (ЕС), за формулою:

$$EC = (nC / N) \times 100 \%, \quad (1)$$

де: nC – кількість отриманих асептичних експлантів, шт.;

N – загальна кількість простерилізованих експлантів, шт.

➤ Життєздатність експлантів (ЖЕ), за формулою:

$$JE = (nJ / N) \times 100 \%, \quad (2),$$

де: nJ – кількість отриманих живих експлантів (без некротичних та інфікованих), шт.

На початковому етапі була визначена оптимальна первинна стерилізація, що дозволило досягти 44,8 % асептичних життєздатних експлантів, а саме: C_2H_5OH (96 %; 10 секунд) + H_2O з детергентом (6 годин) + H_2O_2 (3 %; 10 хвилин) + C_2H_5OH (70 %; 10 секунд).

Подальше визначення оптимальної концентрації, часу експозиції та типу основних реагентів ($AgNO_3$, $NaClO$ і $HgCl_2$) стало можливим завдяки проведенню дискретного аналізу їхнього впливу на ефективність стерилізації та життєздатність експлантів досліджуваного виду. Варто відзначити, що ефективність стерилізації експлантів варіювалася в межах 53,3-100 %, тоді як рівень їхньої життєздатності становив 36,7-100 %.

Після проведення аналізу інтегрованого впливу концентрації стерилізуючого агента та тривалості обробки на ключові показники процесу деконтамінації були визначені оптимальні параметри для кожного з досліджуваних стериліантів (табл. 2).

Таблиця 2

Максимальні показники стерилізації по окремих хімічних агентах

№ з/п	Концентрація та експозиція реагента	*ЕС, %	*ЖЕ, %
1	AgNO ₃ (0,2 %; 10 хв)	80,0	76,7
2	NaClO (20 %; 5 хв)	86,7	83,3
3	HgCl ₂ (1 %; 10 хв)	73,3	73,3

*Примітки: ЕС – ефективність стерилізації; ЖЕ – життєздатність експлантів.

Проведені дослідження дозволили досягти найвищих показників ефективності стерилізації (94,33±1,41 %) та життєздатності експлантів (91,7±1,34 %) для досліджуваного виду за умови застосування запропонованої схеми деконтамінації: C₂H₅OH (96 %; 10 с) + H₂O з детергентом (6 год) + H₂O₂ (3 %; 10 хв) + C₂H₅OH (70 %; 10 с) + AgNO₃ (0,2 %; 5 хв) + NaClO (30 %; 5 хв).

Проведені експериментальні дослідження показали, що як концентрація, так і тривалість обробки основними стерилізантами (AgNO₃, NaClO та HgCl₂) суттєво впливають на ефективність стерилізації та життєздатність експлантів.

Виявлено, що підвищення концентрації AgNO₃ призводить до покращення ефективності стерилізації, тоді як збільшення тривалості обробки викликає лише незначне зростання цього показника, проте водночас може знижувати життєздатність експлантів. Підвищення концентрації діючої речовини NaClO та збільшення часу експозиції під час обробки експлантів сприяє зростанню ефективності стерилізації. Максимального рівня стерильності експлантів сосни звичайної вдалося досягти при концентрації NaClO 30 % та тривалості експозиції 7 хвилин, що забезпечило 93,3 % стерильних зразків. Агент HgCl₂ у всіх досліджуваних випадках забезпечував високий рівень стерильності експлантів сосни звичайної, який становив від 73,3 до 100 %. При цьому ефективність стерилізації залежала більше від концентрації діючої речовини, ніж від тривалості її впливу. Варто зазначити, що збільшення концентрації та експозиції HgCl₂ призводило до зниження життєздатності експлантів. Оптимальний результат за кількістю життєздатних експлантів (73,3 %) був досягнутий при мінімальних значеннях концентрації (1 %) і часу експозиції (5 хвилин).

Список використаних джерел

1. Andersone, U. Changes of Morphogenic Competence in Mature *Pinus sylvestris* L. Buds *in vitro*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4240419/>
2. Niemi, K., Haggman, H., Sarjala, T. Effects of exogenous diamines on the interaction between ectomycorrhizal fungi and adventitious root formation in Scots pine *in vitro*. URL: <https://academic.oup.com/treephys/article/22/6/373/1695186> / Effects-of-exogenous-diamines-on-the-interaction
3. Лісовий, М. М. (2013). Особливості поліморфізму, використання у озелененні та щеплення декоративних форм *Pinus sylvestris* L. Науковий вісник НЛТУ України. Вип. 23(18).
4. Лісовий, М. М. (2016). Особливості розмноження *Pinus sylvestris* L. в умовах *in vitro*. Науковий вісник НЛТУ України. Вип. 26.8.
5. Мельничук, М. Д., Новак, Т. В., Кунах, В. А. (2003). Біотехнологія рослин. Київ: ПоліграфКонсалтинг.
6. Шлапак, В. В., Небиков, М. В. (2011). Особливості насінневого розмноження *Pinus sylvestris* L. в умовах *in vitro*. Науковий вісник НЛТУ України. Вип. 21(14).