

УДК 518.143.6:634.2

© 2018

ВИКОРИСТАННЯ ПРЕПАРАТУ ЛІЗОФОРМІН 3000 ДЛЯ ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ ЖИМОЛОСТІ В УМОВАХ IN VITRO

Я.С. Запольський¹, Т.В. Медведєва², Т.А. Натальчук³, М.О. Бублик⁴

²кандидат біологічних наук

³кандидат сільськогосподарських наук

⁴доктор сільськогосподарських наук

Інститут садівництва НААН, вул. Садова, 23, м. Київ, 03027, Україна

e-mail: ¹ya.zapolskyi91@gmail.com, ²medvedevaty@ukr.net,

³tania87@meta.ua, ⁴mbublyk@ukr.net

Надійшла 10.07.2018

Мета. Дослідити вплив препарату Лізоформін 3000 на патогенну мікрофлору при отриманні асептичної культури жимолості їстівної (*Lonicera edulis Turcz*) та на подальшу регенерацію рослин залежно від методу стерилізації та стану вихідних рослин. **Методи.** Лабораторний, математичний, розрахунково-порівняльний. **Результати.** Досліджено вплив стерилізаційних речовин на отримання асептичної культури жимолості їстівної в умовах in vitro. Досліди проводили на сортах: Алісія, Спокуса, Чайка, Німфа, Дочь Велікана, Каріна. Стерилізаційним агентом був Лізоформін 3000 за різного часу стерилізації та розчин сулеми як контроль. Етапи стерилізації на контролі включали такі складові: 1) обробка експлантів у розчині гіпохлориту натрію – 20 хв із наступним промиванням у воді; 2) стерилізація спиртом (C_2H_5OH) – 20 с із промиванням у воді; 3) стерилізація в розчині сулеми ($HgCl_2$) – 2 хв із 3-разовим промиванням стерильною дистильованою водою. У варіанті із вивченням препарату Лізоформін 3000 замість розчину сулеми використовували досліджуваний препарат за експозицій 5, 7 та 10 хв. **Висновки.** Для максимального отримання стерильних і життєздатних експлантів велике значення має стерилізаційний агент та його токсичність. Препарат Лізоформін 3000 за відповідних концентрації та тривалості стерилізації слід рекомендувати для отримання асептичної культури жимолості їстівної. На фоні застосування цього препарату з експозицією 5 хв за ефективністю регенерації виділено 3 групи сортів жимолості їстівної: з високою регенераційною здатністю (94 – 96%) – Алісія, Каріна і Спокуса; з середньою регенераційною (86 – 87%) – Чайка і Дочь Велікана та з низькою регенераційною здатністю (80%) – Німфа. Препарат Лізоформін 3000 у концентрації 3% і тривалістю експозиції 5 хв забезпечує оптимальну ефективність стерилізації та регенерації експлантів жимолості їстівної і не знижує їх коефіцієнтів розмноження. Препарат Лізоформін 3000 за відповідних концентрації та тривалості стерилізації слід рекомендувати для отримання асептичної культури сортів жимолості.

Ключові слова: жимолість, стерилізація, лізоформін, експлант, *in vitro*, введення в культуру, проліферація.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201809-07>

Культура *in vitro* та мікроклональне розмноження рослин — перспективний метод, що дає змогу за короткі строки на невеликих площах і незалежно від погодних умов отримувати у великих кількостях якісний садивний матеріал плодкових і ягідних культур. Технологія мікроклонального розмноження будь-якої культури включає 4 основні етапи: введення вихідної форми в стерильну культуру, власне розмноження, укорінення розмножених мікропагонів та їх адаптація до вирощування у ґрунті.

Введення в культуру — один із основних етапів, який призводить до великих затрат. Для найвдалішого проведення цього етапу потрібно підібрати фазу активного фізіологічного розвитку рослини та відповідні стерилізаційні засоби. Під час вибору стерилізаційного агента слід зважати на його токсичність і вплив на подальший розвиток рослини загалом. Нині найефективнішими залишаються ртутні препарати, але їхня токсичність пригнічує подальший розвиток мікророслин [1]. Так, за використання 0,10%-го розчину хлориду ртуті (HgCl_2) для отримання асептичної культури жимолості сортів Челябінка та Дуєт регенерація з первинних експлантів становила 65,9 і 64,9% відповідно [2]. Збільшення концентрації до 0,15% забезпечило вихід стерильних експлантів на рівні 95%, з яких надалі регенерували 67,5% [3]. За використання 0,2% сульфату ртуті (HgSO_4) спостерігається проліферація у 54,43% експлантів, взагалі не розвивається 4,57% [4]. Препарат Лізоформін 3000 успішно використовували для стерилізації експлантів декоративних і плодово-ягідних культур 29-ти сортів 14-ти видів 13-ти родів, що належать до 3-х родин [5]. Інші стерилізаційні засоби (гіпохлорит натрію та кальцію, перекис водню) не забезпечують задовільного виходу стерильних експлантів, тому пошук ефективних і менш токсичних стерилізаційних агентів для отримання асептичної культури жимолості істотно є актуальною проблемою.

Мета досліджень — дослідити вплив препарату Лізоформін 3000 на патогенну

мікрофлору за отримання асептичної культури жимолості істотної та на подальшу регенерацію рослин залежно від методу стерилізації та стану вихідних рослин.

Матеріали та методика. Досліди проводили у 2016–2017 рр. у відділі вірусології, оздоровлення та розмноження плодкових і ягідних культур Інституту садівництва НААН. Для стерилізації використовували експланти таких сортів жимолості: Алісія, Спокуса, Чайка (Україна), Каріна (Польща), Дочь Великана, Німфа (Росія). Відбір дерев'яних пагонів зі сплячими бруньками виконували у ранньовесняний період (лютий — квітень) [6–8]. Оскільки для жимолості характерні бруньки змішаної будови, з кожного генотипу відбирали для стерилізації вегетативні бруньки (5–10 мм) після цвітіння пророщених у контрольованих умовах пагонів. Стерилізацію проводили за допомогою гіпохлориту натрію, спирту, розчину сулеми (контроль) і препарату Лізоформін 3000. До складу останнього входить глюксаль (7,5%), глутаровий альдегід (9,5%), дідецилдіметиламоній хлорид (9,6%) і різні допоміжні інгредієнти. Препарат має бактерицидну (зокрема спороцидну), віроцидну і фунгіцидну дію. Засіб зберігає свої властивості навіть після замерзання і подальшого відтавання. За параметрами токсичності належить до 3-го класу помірно небезпечних речовин. Високий вихід життєздатних експлантів (70–95%) за використання 1–3%-го розчину Лізоформіну протягом 5–7 хв отримано для ряду рідкісних і зникаючих видів рослин під час стерилізації насіння, ізолюваних зародків та сегментів бульб [9]. І варіант стерилізації включав такі етапи: 1) обробка експлантів у розчині гіпохлориту натрію — 20 хв із наступним промиванням у воді; 2) стерилізація спиртом ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) — 20 с із промиванням у воді; 3) стерилізація в розчині сулеми (HgCl_2) — 2 хв із 3-разовим промиванням стерильною дистильованою водою. У II варіанті розчин сулеми замінили на розчин лізоформіну і стерилізацію проводили 5, 7 та 10 хв. Експланти висаджували на середовище Мурашіге–Скуга [10], що

містило 0,5 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП).

Ефективність стерилізаційних процедур підраховували на 21-шу добу культивування експлантів. За цей час асептичні експланти почали розвиватись, а інфіковані були відбраковані.

Результати досліджень. Дослідженнями встановлено, що ефективність стерилізації була високою (табл. 1). У контрольному варіанті досліду та у варіантах з використанням Лізоформіну 3000 з експозицією 7 та 10 хв вона була 100%-ю. За використання Лізоформіну 3000 з експозицією 5 хв по сортах Чайка, Дочь Великана та Німфа не вдалося досягти повної стерилізації, хоча вона і перевищувала 90%.

Кількість життєздатних експлантів значно різнилася залежно від сорту та тривалості стерилізаційних процедур. У контрольному варіанті показник коливався від 56 до 69% і визначався помологічним сортом. Істотно вищим порівняно з контролем був показник життєздатних експлантів при застосуванні Лізоформіну 3000. Отже, використання як стерилізаційного агента розчину сулеми є неприйнятним не лише з погляду її токсичності, а й через негативний вплив на процес регенерації.

У варіанті з застосуванням Лізоформіну 3000 з експозицією 5 хв за ефективністю регенерації вирізняються 3 групи сортів: із високою регенераційною здатністю (94–96%) — Алісія, Каріна і Спокуса; з середньою регенераційною (86–87%) — Чайка і Дочь Великана та з низькою регенераційною здатністю (80%) — Німфа.

При застосуванні Лізоформіну 3000 з експозицією 7 та 10 хв сортові особливості регенерації в основному збереглися — високою регенераційною здатністю вирізняються сорти Алісія і Каріна, низькою — Дочь Великана та Німфа.

Щодо впливу тривалості стерилізації Лізоформіном 3000, то її збільшення на 5–7 хв не призводить до істотного зростання регенераційної здатності рослин (сорти Алісія, Каріна, Чайка, Німфа) або навіть істотно знижує цей показник (сорти Спокуса, Дочь Великана). У варіанті з тривалістю стерилізації Лізоформіном 3000 10 хв регенераційна здатність більшості сортів знижується.

Отже, кращим варіантом слід визнати варіант з найменшою тривалістю стерилізації Лізоформіном 3000 — 5 хв. Однак стерилізаційні агенти і тривалість їх застосування впливають не тільки на ефективність

1. Вплив стерилізаційних агентів на ефективність стерилізації та регенерації експлантів жимолюсті, %

| Сорт | 0,1% HgCl ₂ (контроль) | | Лізоформін 3000 | | | | | |
|---------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|----|
| | | | Тривалість стерилізації, хв | | | | | |
| | | | 5 | | 7 | | 10 | |
| | Ефективність | | | | | | | |
| стерилізації | регенерації | стерилізації | регенерації | стерилізації | регенерації | стерилізації | регенерації | |
| Каріна | 100 | 69 | 100 | 95 | 100 | 97 | 100 | 95 |
| Алісія | 100 | 67 | 100 | 96 | 100 | 95 | 100 | 92 |
| Спокуса | 100 | 61 | 100 | 94 | 100 | 91 | 100 | 87 |
| Чайка | 100 | 63 | 95 | 87 | 100 | 88 | 100 | 86 |
| Дочь Великана | 100 | 59 | 90,8 | 86 | 100 | 76 | 100 | 73 |
| Німфа | 100 | 56 | 93,6 | 80 | 100 | 78 | 100 | 74 |

Для ефективності регенерації: за варіантами досліду НІР₀₅=2,1; сортів — НІР₀₅=2,7.

2. Коефіцієнти розмноження експлантів сортів жимолості *in vitro*

| Сорт | 0,1% HgCl ₂ (контроль) | Лізоформін 3000 | | |
|---|--------------------------------------|-----------------------------|------|------|
| | | Тривалість стерилізації, хв | | |
| | | 5 | 7 | 10 |
| Каріна | 2,46 | 3,45 | 3,36 | 3,06 |
| Алісія | 1,58 | 2,34 | 2,17 | 2,02 |
| Спокуса | 1,92 | 2,58 | 2,21 | 2,1 |
| Чайка | 1,66 | 2,47 | 2,02 | 1,99 |
| Дочь Великана | 1,5 | 2,04 | 1,93 | 1,87 |
| Німфа | 1,66 | 2,38 | 1,99 | 1,89 |
| За варіантами досліду НІР ₀₅ =0,30; за сортами НІР ₀₅ =0,24. | | | | |

стерилізації та регенерації експлантів жимолості, а й на коефіцієнти розмноження останніх (табл. 2). Дослідженнями встановлено, що використання Лізоформіну 3000 для стерилізації істотно збільшує коефіцієнт розмноження експлантів усіх сортів, що вивчалися порівняно з 0,1% HgCl₂. Так, у варіанті з використанням Лізоформіну 3000

з експозицією 5 хв у середньому за сортами цей показник зріс більше ніж на 40%.

Слід зазначити, що коефіцієнти розмноження експлантів залежали від помологічного сорту: найвищим він був у сорту Каріна — 3,45, найнижчим — у сорту Дочь Великана — 2,04, у інших сортів цей показник займав проміжне місце. Водночас сорти цієї групи істотних відмінностей за коефіцієнтом розмноження експлантів не мали.

Збільшення експозиції Лізоформіну 3000 також певним чином впливало на коефіцієнт розмноження експлантів. Так, у варіанті з експозицією 10 хв порівняно з варіантом з експозицією 5 хв цей показник істотно зменшився в усіх сортів, за винятком сорту Дочь Великана. Не такими однозначними виявилися результати у варіанті з експозицією 5 хв: у сортів Спокуса, Чайка і Німфа коефіцієнт розмноження експлантів зменшився істотно, а в інших сортів спостерігалася тенденція до його зменшення.

Отже, за коефіцієнтом розмноження експлантів найбільш прийнятним варіантом слід визнати використання Лізоформіну 3000 з тривалістю експозиції 5 хв.

Висновки

У результаті проведених досліджень нами встановлено, що препарат Лізоформін 3000 у концентрації 3% і тривалістю експозиції 5 хв забезпечує оптимальну ефективність стерилізації та регенерації експлантів жимолості їстівної і не знижує їх коефіцієнтів розмноження. На фоні застосування Лізоформіну 3000 з експозицією 5 хв за ефективністю регенерації виділено 3 групи сортів

жимолості їстівної: з високою регенераційною здатністю (94–96%) — Алісія, Каріна і Спокуса; з середньою регенераційною (86–87%) — Чайка і Дочь Великана та з низькою регенераційною здатністю (80%) — Німфа. Зважаючи на різну реакцію сортів експлантів жимолості їстівної на препарат Лізоформін 3000, слід продовжити дослідження з новими перспективними сортами цієї культури.

Запольский Я.С.¹, Медведева Т.В.², Натальчук Т.А.³, Бублик Н.А.⁴

Институт садоводства НААН, ул. Садовая, 23, г. Киев, 03027, Украина; e-mail: ¹ya.zapolskyi91@gmail.com, ²medvedevatv@ukr.net, ³tanial87@meta.ua, ⁴mbublyk@ukr.net

Использование препарата Лизоформин 3000 для получения асептической культуры жимолости в условиях *in vitro*

Цель. Исследовать влияние препарата Лизоформин 3000 на патогенную микрофлору

при получении асептической культуры жимолости съедобной (*Lonicera edulis* Turcz) и на дальнейшую регенерацию растений в зависимости от метода стерилизации и состояния исходных растений. **Методы.** Лабораторный, математический, расчетно-сравнительный. **Результаты.** Исследовано влияние стерилизующих веществ на получение асептической культуры жимолости съедобной в условиях *in vitro*. Опыты проводили на сортах: Алисия, Спокуса, Чайка, Нимфа, Дочь Великана, Карина. В качестве стерилизующих

агентов использовали Лизоформин 3000 при разном времени стерилизации и раствор сулемы в качестве контроля. Этапы стерилизации на контроле включали следующие составляющие: 1) обработка эксплантов в растворе гипохлорита натрия — 20 мин с последующим промыванием в воде; 2) стерилизация спиртом (C₂H₅OH) — 20 сек с промыванием в воде; 3) стерилизация в растворе сулемы (HgCl₂) — 2 мин с 3-кратным промыванием стерильной дистиллированной водой. В варианте с изучением препарата Лизоформин 3000 вместо раствора сулемы использовали исследуемый препарат при экспозициях 5, 7 и 10 мин. **Выводы.** Для максимального получения стерильных и жизнеспособных эксплантов большое значение имеет стерилизующий агент и его токсичность. Препарат Лизоформин 3000 при соответствующих концентрации и продолжительности стерилизации следует рекомендовать для получения асептической культуры жимолости съедобной. На фоне применения этого препарата с экспозицией 5 мин по эффективности регенерации выделили 3 группы сортов жимолости съедобной: с высокой регенерационной способностью (94–96%) — Алисия, Карина и Спокуса; со средней регенерационной (86–87%) — Чайка и Дочь Великана и с низкой регенерационной способностью (80%) — Нимфа. Препарат Лизоформин 3000 в концентрации 3% и продолжительностью экспозиции 5 мин обеспечивает оптимальную эффективность стерилизации и регенерации эксплантов жимолости съедобной и не снижает их коэффициентов размножения. Препарат Лизоформин 3000 при соответствующих концентрации и продолжительности стерилизации следует рекомендовать для получения асептической культуры сортов жимолости.

Ключевые слова: жимолость, стерилизация, лизоформин, эксплант, *in vitro*, введение в культуру, пролиферация.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201809-07>

Zapolskyi Ya.¹, Medvedeva T.², Natalchuk T.³, Bublyk M.⁴

Institute of gardening of NAAS, Sadova Str., 23, Kyiv, 03027, Ukraine; e-mail: ¹ya.zapolskyi91@gmail.com, ²medvedevvatv@ukr.net, ³tania87@meta.ua, ⁴mublyk@ukr.net

Use of preparation Lizoformin 3000 for obtaining aseptic cultures of honeysuckle in conditions *in vitro*

The purpose. To investigate influence of preparation Lizoformin 3000 against pathogenic microflora at obtaining aseptic cultures of honeysuckle (*Lonicera edulis* Turcz) and on the further regeneration of plants depending on method of sterilization and state of initial plants. **Methods.** Laboratory, mathematical, calculation-comparative. **Results.** Influence of sterilizing substances on obtaining aseptic cultures of honeysuckle in conditions *in vitro* is studied. Experiment were spent on grades: Alisia, Spokusa, Chaika, Nimfa, Dochka Veletnia, Karina. As sterilizing agents they used Lizoformin 3000 at different time of sterilization and solution of mercury bichloride as the control. Stages of sterilization on the control included the following components: 1) treatment of explants in solution of sodium hypochlorite — 20 min with subsequent washing in water; 2) sterilization with spirit (C₂H₅OH) — 20 sec with washing in water; 3) sterilization in solution of mercury bichloride (HgCl₂) — 2 min with 3-times washing in sterile distilled water. In the variant with studying preparation Lizoformin 3000 instead of solution of mercury bichloride they used the studied preparation at expositions of 5, 7 and 10 min. **Conclusions.** For the maximal obtaining of sterile and viable explants the sterilizing agent and its toxicity has great value. Preparation Lizoformin 3000 at corresponding concentration and duration of sterilization should be recommended for obtaining aseptic cultures of honeysuckle. On the background of application of that preparation with exposition of 5 min they allocated by efficiency of regeneration 3 groups of varieties of honeysuckle: with high reclaiming ability (94–96%) — Alisia, Karina and Spokusa; with average reclaiming ability (86–87%) — Chaika and Dochka Veletnia, and with low reclaiming ability (80%) — Nimfa. Preparation Lizoformin 3000 in concentration of 3% and with duration of exposition of 5 min provides optimum efficiency of sterilization and regeneration of explants of honeysuckles and does not reduce their factors of duplication. Preparation Lizoformin 3000 at corresponding concentration and duration of sterilization should be recommended for obtaining aseptic cultures of varieties of honeysuckle.

Key words: honeysuckle, sterilization, Lizoformin, explant, *in vitro*, introduction in culture, proliferation.

<https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201809-07>

Бібліографія

1. Акимова С.В., Семенова Н.А., Викулина А.Н. Применение этиоляции на различных этапах микроклонального размножения жимолости (*Lonicera* L.) подсемейства *Caerulea* Rehd.

Труды БГУ. 2013. № 8. С. 33–37.

2. Dziedzic E. Propagation of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica* Pojark.) in *in vitro* culture. *J. of fruit and ornamental plant*

research. 2008. № 16. P. 93–100.

3. Sedlák J., Paprštejn F. *In vitro* propagation of blue honeysuckle. HORT. SCI. (PRAGUE). 2007. № 34. P. 129–131.

4. Krupa-Malkiewicz M., Ochmian I. Propagation of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) in *in vitro* culture. *J. of basic & applied sciences*. 2014. № 10. P. 164–169.

5. Блюднева Е.А., Крицкая Т.А., Кашин А.С. Использование клонального микроразмножения для массового получения посадочного материала декоративных и плодово-ягодных культур в Ботаническом саду СГУ. *Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета*. Саратов: изд-во Саратов. ун-та, 2013. Вып. 11. С. 119–131.

6. Муратова С.А., Янковская М.Б., Шорников Д.Г. Особенности введения в культуру *in*

vitro плодовых и ягодных растений. *Плодоводство: Ин-т пловодства Нац. акад. наук Беларуси*. Самохваловичи, 2005. Т. 17. Ч. 2. С. 182–185.

7. Высоцкий В.А., Валиков В.А. Клональное микроразмножение жимолости в производственных условиях. *Садоводство и виноградарство*. 2014. № 6. С. 18–19.

8. Hui J.X., Wen S.Ch., Hua Z.Y., Ming I.X. Comparative study on different methods for *Lonicera japonica* Thunb. micropropagation and acclimatization. *J Med Plant Res*, 2012; 6. P. 4389–4393.

9. Чаркова А.А. Редкие и исчезающие виды растений в культуре *in vitro*. *Огарев-online*, 2013. № 11.

10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962; 15. P. 473–497.