



Т. С. РИЖЕНКО

ОПТИМІЗАЦІЯ РЕЖИМУ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ЕКСПЛАНТІВ *JUGLANS REGIA* L.

Український науково-дослідний інститут лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г. М. Висоцького

Презентовано результати дослідів зі стерилізації експлантів горіха волоського (*Juglans regia* L.) із використанням різних хімічних речовин. Дослідження проведено в лабораторії мікроклонального розмноження УкрНДЛГА. Відібрано зразки з дерева, яке росте у місті Харкові, з січня до квітня включно. Як первинні експланти використовували фрагменти здерев'янілих пагонів завдовжки 1–2 см. Дослідження охоплювали виявлення кращих режимів стерилізації рослинного матеріалу горіха волоського для подолання фенольного окислення та запобігання ураженню грибами та іншими патогенами. Як основні стерилізаційні речовини використано Лізоформін-3000, нітрат срібла ( $\text{AgNO}_3$ ), антибіотик Цефотаксим. Життєздатність експлантів оцінювали через 25 діб. Результати проведених досліджень свідчать, що використання Лізоформіну-3000 як стерилізувального агента не є ефективним. Застосування нітрату срібла  $\text{AgNO}_3$  не сприяло подоланню внутрішньої інфекції, що призвело до подальшої некротизації мікропагонів горіха. Використання антибіотика Цефотаксим в поживному середовищі (MS без модифікацій) дало змогу подолати фенольну інтоксикацію та розвиток інфекції в експлантах горіха волоського.

Ключові слова: мікроклонування, стерилізатори, *in vitro*, розмноження.

**Вступ.** Волоський горіх (*Juglans regia* L.) є найважливішою горіхоплодою культурою в Україні зі значним експортним потенціалом. Ця рослина походить із Середньої Азії та деяких регіонів Кавказу, її культивують у багатьох країнах – від Південно-Східної Європи до Східної Азії, а також у Північній і Південній Америці (Yermolenko 1935, Shchepotiev 1957, Pollegioni et al. 2017). Дерева волоського горіха є важливою ознакою ландшафтів України вже не одне століття.

Україна входить до п'ятірки найпотужніших країн-виробників волоського горіха у світі. Частка України у світовому виробництві за останні п'ять років становить 5 % (частка Китаю – 40 %, США – 32 %, Чилі – 6 %, Іран – 5 %, Франція – 2 %, інші країни разом – 10 %) (Mezhenskyi 2020).

Селекцію горіха волоського методом індивідуального відбору в Україні розпочато ще у 30-ті роки минулого сторіччя під керівництвом А. П. Єрмоленка та А. Ф. Скоробогатого (Yermolenko 1935, 1936, Skorobogaty 1936). Найбільшого розвитку селекційна робота набула в другій половині ХХ сторіччя (Shchepotiev 1957, 1964). У подальші роки методами відбору та гібридизації отримано цінні форми: 'Курзим' і 'Красавець' Ф. Л. Щепотьєва, 'Колхозний' – Ф. А. Павленка, Ю. І. Новака та П. П. Бадалова. Для збереження сортових ознак і створення промислових плантацій застосовують вегетативно розмножений садивний матеріал, переважно щеплений. Водночас у зв'язку з технічною складністю проведення щеплень і нерідко поганим ростом щепи та підщепи виникає потреба в опрацюванні методів вирощування кореневласного вегетативно розмноженого матеріалу, зокрема отриманого в культурі *in vitro*.

Методи мікроклонального розмноження одночасно є способом збереження рідкісних форм та цінних сортів і створення нових високопродуктивних форм рослин (Butenko 1986). Розмноження рослин у культурі *in vitro* дає змогу за мінімальної кількості маточних рослин отримати велику кількість морфологічно вирівняного та генетично однорідного садивного матеріалу (Mamchur 2017). Окрім того, у кореневласних рослин, розмножених в умовах *in vitro*, є більш розвиненою коренева система, вони випереджають за репродуктивним розвитком щеплені – звідси більш ранній початок плодоношення дерева та нарощування врожайності (Navatel & Bourrain 2001).

Ефективність уведення рослин у культуру *in vitro* залежить від сукупності чинників, найбільш важливими з яких є видові та сортові особливості, фізіологічний вік дерев, стан і фаза росту донорської (материнської) рослини, тип і розміри вилучених із неї експлантів, ступінь їхньої фітосанітарної чистоти, тип стерилізувальної речовини та тривалість

оброблення нею (Kushnir & Sarnatska 2005). До того ж метод мікроклонального розмноження можна застосовувати з метою прискорення селекційного процесу, що є особливо актуальним для культури горіха волоського (Titarenko 2009).

Мікроклональне розмноження волоського горіха відіграло дуже важливу роль у швидкому розповсюдженні бажаних сортів та отриманні здорових незаражених рослин. Протягом останніх кількох років використані різні підходи до розмноження цього виду в умовах *in vitro*: верхівковими та бічними бруньками, пагонами, сім'ядолями тощо (Payghamzadeh & Kazemitabar 2011).

Вирощування рослин із пазушних бруньок або пагонів виявилось найбільш загальнодоступним і надійним методом розмноження (George et al. 2008). Культура мікророзмноження, в якій експланти (бруньки або пагони) асептично вирізають і культивують на середовищі, забезпечує швидке розмноження рослин, зменшення циклу генерації таких деревних видів як волоський горіх, де періоду стратифікації насіння сягає 2–3 місяці (Leslie & McGranahan 1992).

Найбільшою проблемою мікророзмноження волоського горіха є чутливість до окислення фенольними сполуками в експлантатах, подоланню якої присвячено низку робіт. Так, у дослідженнях М. Myrselaj, V. Sota й E. Kongjika (2020) використовували для попереднього оброблення експлантатів розчин аскорбінової кислоти (5 мг/л), тоді як К. Керенек і Z. Kolağasi (2016) у дослідах застосовували також оксидант полівінілпіролідон (PVP) (500 мг/л) і цистеїн (20 мг/л). У інших роботах (Navatel & Bourrain 2001, Payghamzadeh & Kazemitabar 2011) антиоксиданти (аскорбінова або лимонна кислота) були включені до складу поживних середовищ із метою запобігання окислюванню рослинного матеріалу горіха. Менш проблематичним є подолання зараження грибними та іншими збудниками всередині експлантатів, укорінення та труднощі, пов'язані з переведенням у ґрунт (режимами вологості, температури, природного освітлення).

Таким чином є важливим удосконалення методів мікророзмноження горіха волоського для подальшого розповсюдження генетично однорідного матеріалу у зв'язку з економічним та екологічним значенням виду (Керенек & Kolağasi 2016).

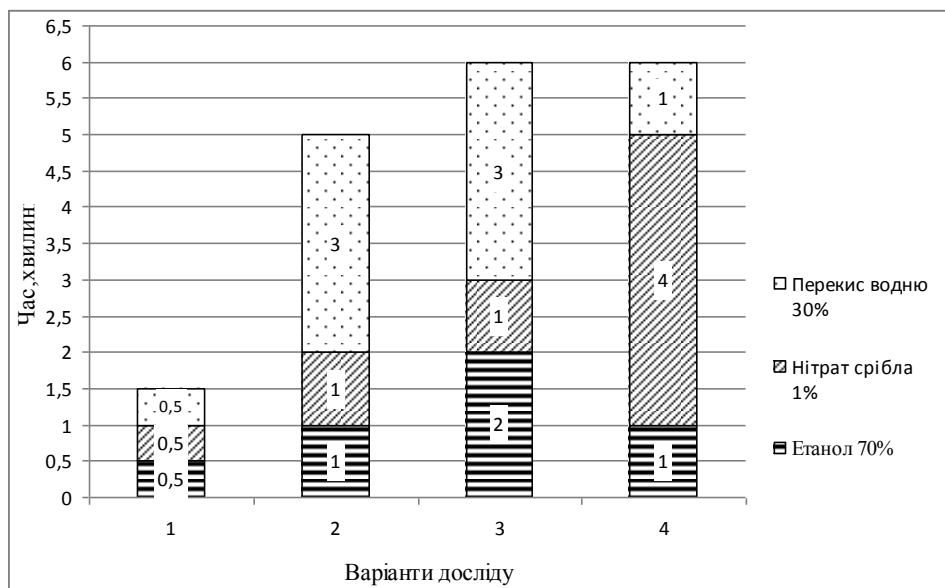
*Мета дослідження* – визначити найперспективніші методи стерилізації рослинного матеріалу *Juglans regia* L.

**Матеріали й методи.** Дослідження проведено в лабораторії мікроклонального розмноження УкрНДІЛГА. Використовували рослинний матеріал, який заготовляли протягом січня – квітня з багаторічного дерева в м. Харкові.

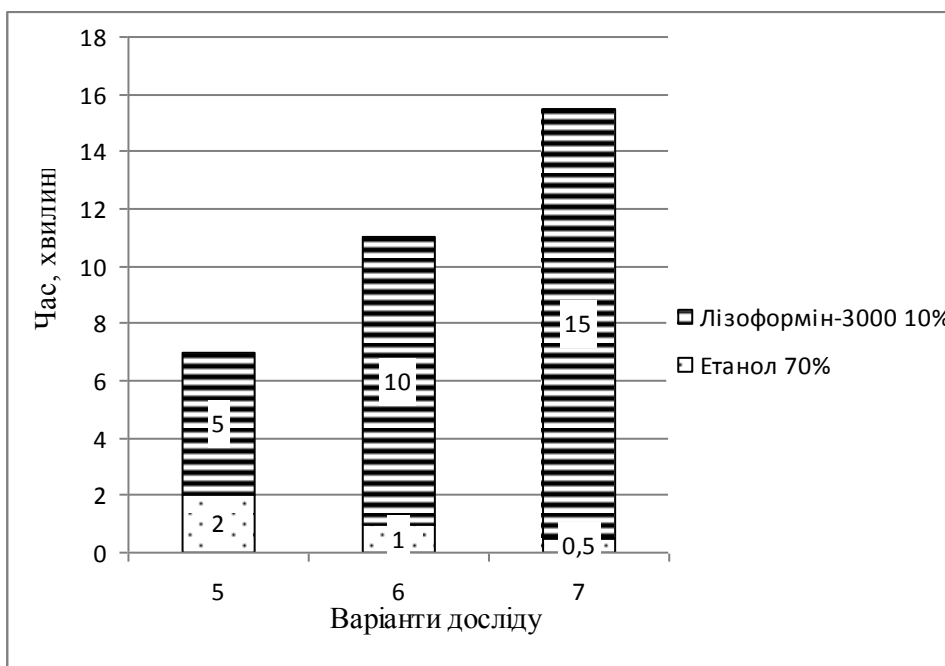
Для стерилізації експлантів від патогенної мікрофлори застосовували три варіанти складу хімічних речовин із різною тривалістю дії стерилізаторів. Загалом закладено три досліді (11 варіантів).

*Дослід № 1.* Рослинний матеріал промивали щіткою під проточною водою з додаванням мийного засобу (Fairly). Експланти у вигляді мікроживців з однією (рідше – двома) бруньками промивали в мильному розчині протягом 20 хвилин, а потім стерилізували 70 % розчином етанолу (0,5–3 хв.) із подальшим промиванням у стерильній дистильованій воді. Наступним етапом стерилізації було занурення експлантів у 1 % розчин нітрату срібла ( $\text{AgNO}_3$ ) (0,5–4 хв.) із подальшим промиванням у стерильній дистильованій воді. Після цього обробляли у 30 % розчині перекису водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) протягом 3 хв. Після завершення стерилізації експланти тричі по 3 хв. промивали стерильною дистильованою водою та висаджували на живильне середовище MS без модифікацій (рис. 1).

*Дослід № 2.* Застосовували етапи промивання з досліді № 1, потім стерилізували експланти 70 % розчином етанолу (0,5–2 хв.) з подальшим промиванням у стерильній дистильованій воді, далі занурювали в 10 % розчин Лізоформіну-3000 (5–15 хв.). Після стерилізації рослини промивали стерильною водою протягом 10 хв. і висаджували на поживне середовище MS без модифікацій (рис. 2).



**Рис. 1 – Режими стерилізації горіха волоського (*Juglans regia L.*) з основним компонентом – нітратом срібла ( $\text{AgNO}_3$ ), дослід № 1 (4 варіанти)**

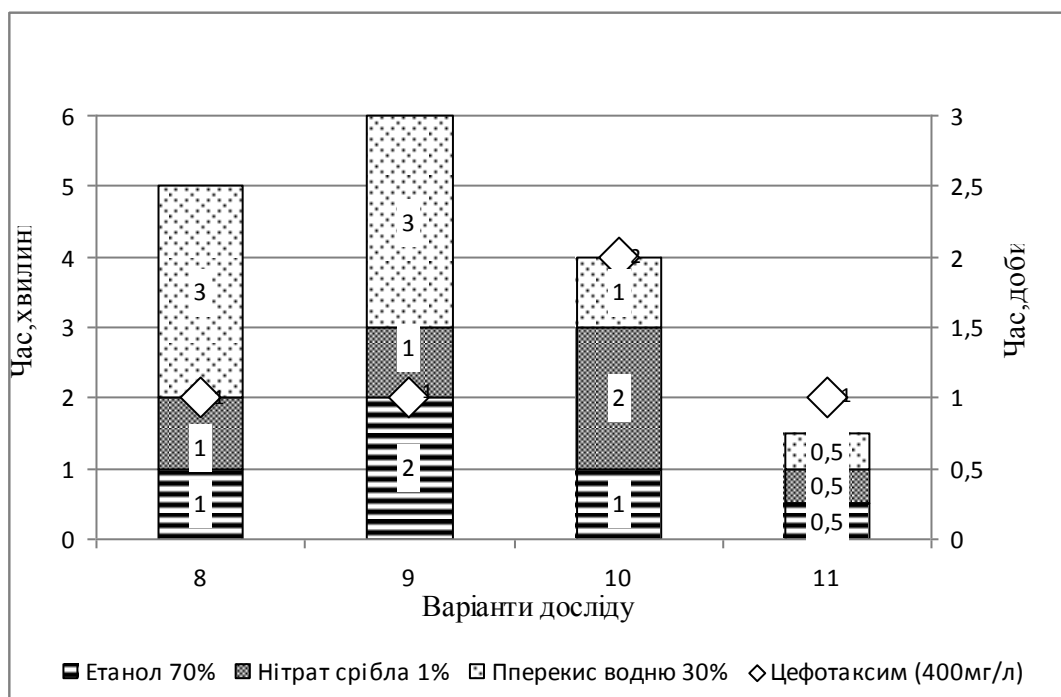


**Рис. 2 – Режими стерилізації горіха волоського (*Juglans regia L.*) з основним компонентом – Лізоформіном-3000, дослід № 2 (3 варіанти)**

*Дослід № 3.* Здійснювали передстерилізаційне оброблення матеріалу мийними засобами. Повторювали всі етапи з дослідів № 1. Готували поживне середовище MS із додаванням антибіотика Цефотаксим (400 мг/л), розливаючи його в стерильні чашки Петрі. Розміщували в них по 3–5 експлантів і ставили в холодильник на 1–2 доби, після чого пересаджували на поживне середовище MS без модифікацій (рис. 3).

Усі середовища стерилізували методом автоклавування за температури 120°C і тиску 1 атм. протягом 20–30 хвилин. Антибіотик додавали після автоклавування.

Упродовж 7 діб у кожному з варіантів визначали ефективність стерилізації, реєструючи кількість стерильних та інфікованих експлантів. Життєздатність оцінювали через 25 діб, підраховуючи частку стерильних та інфікованих мікророзривків.

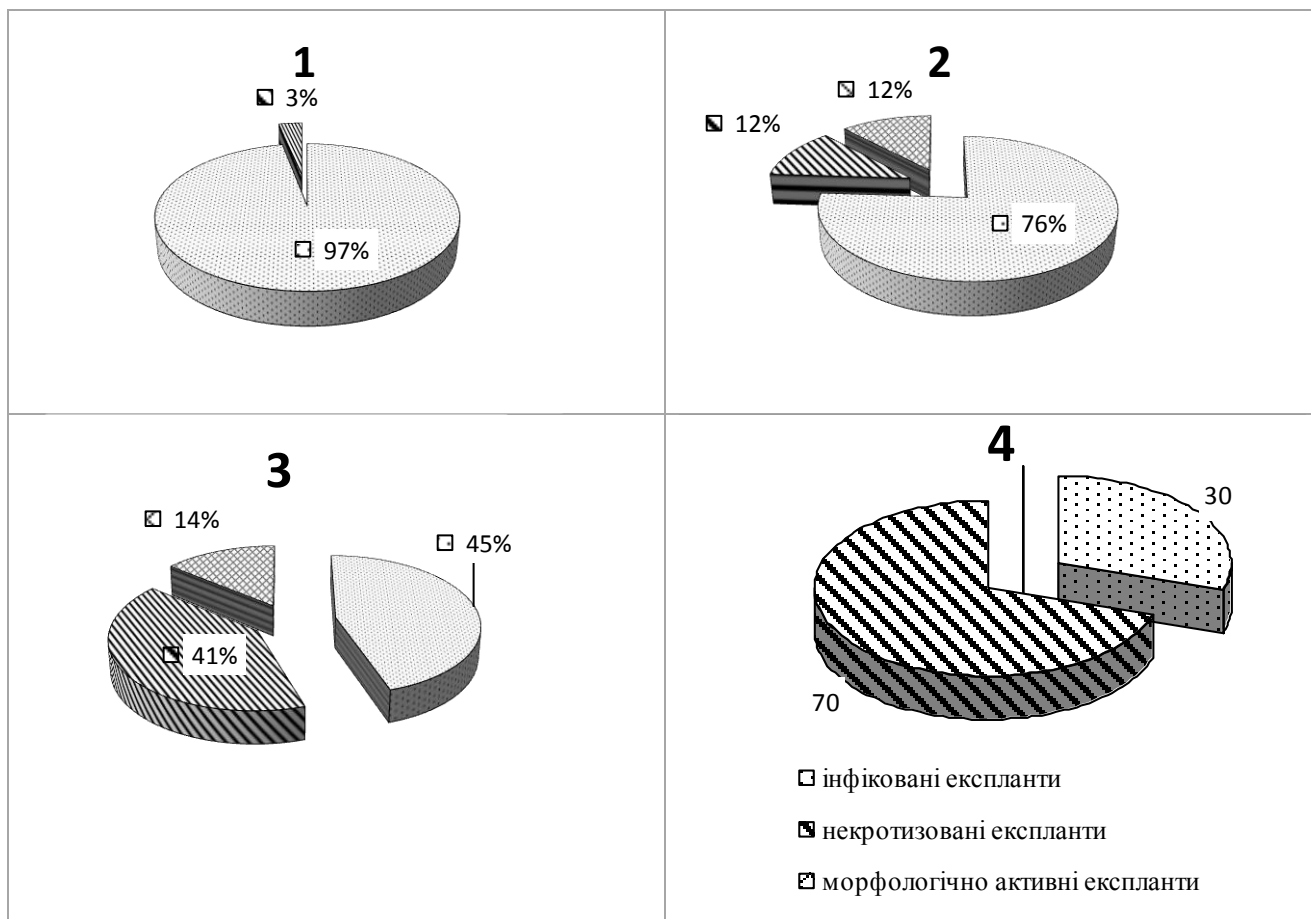


**Рис. 3 – Режими стерилізації горіха волоського (*Juglans regia* L.) з основним компонентом – антибіотиком Цефотаксим, дослід № 3 (4 варіанти)**

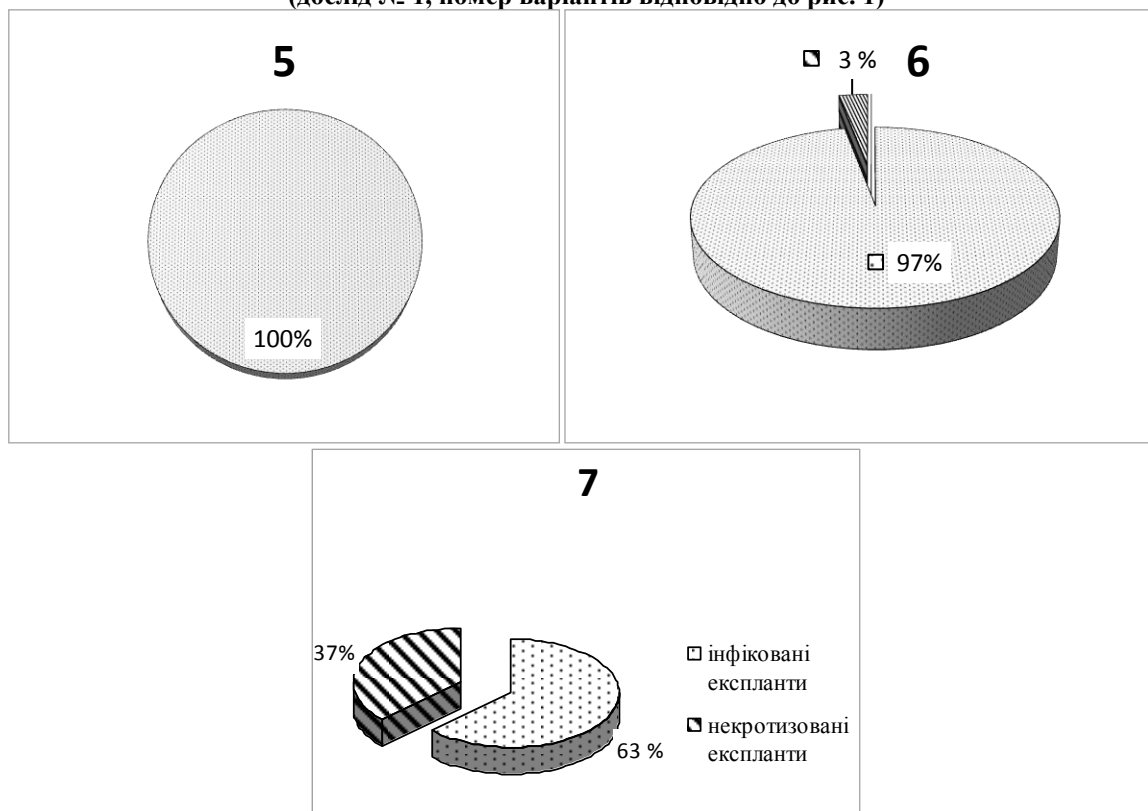
**Результати та обговорення.** Аналіз варіантів дослідів № 1 свідчить, що під час використання нітрату срібла ( $\text{AgNO}_3$ ) як одного з основних компонентів стерилізувальних речовин із нетривалим часом експозиції (0,5–1 хв.) отримали 76–97 % інфікованих і 3–12 % некротизованих експлантів (варіанти № 1, 2). У результаті дослідів отримано 12–14 % морфологічно активних регенерантів у варіантах № 2 та 3, проте в разі збільшення часу стерилізації етанолом до 2 хв. частина морфологічно активних рослин горіха волоського зменшувалася. Тривала експозиція в стерилізувальних речовинах – 2 хв. у розчині етанолу та понад 1 хв. у розчині нітрату срібла  $\text{AgNO}_3$  – призвела до некротизації тканин у великій частки експлантів у варіанті № 4 (70 %). Водночас прояви внутрішньої інфекції виявляли протягом усього часу культивування з подальшою повною некротизацією. Це свідчить про низьку ефективність використання цих хімічних речовин у такій комбінації (рис. 4).

Під час використання Лізоформіну-3000 10 % (дослід № 2) як стерилізувальної речовини не вдалося одержати життєздатних експлантів через некротизацію (3–37 %) та зараження грибами й бактеріями (63–100 %) (рис. 5). Збільшення тривалості експозиції в стерилізувальних реагентах (Лізоформін-3000  $\geq$  10 хв.) призводило до збільшення частки некротизованих рослин. Навіть у варіанті зменшення часу дії етанолу (70 %) до 0,5 хв. некротизація не зменшилася (варіанти 5–7). Отже, така процедура стерилізації у наших дослідів виявилася неефективною. Під час використання нітрату срібла з додаванням антибіотика Цефотаксим до поживного середовища (400 мг/л) частка заражених експлантів зменшилася проти попередніх двох дослідів (45–100 %) до 9–39 % (дослід № 3), що дало змогу отримати 65–73 % морфологічно активних експлантів горіха волоського (рис. 6).

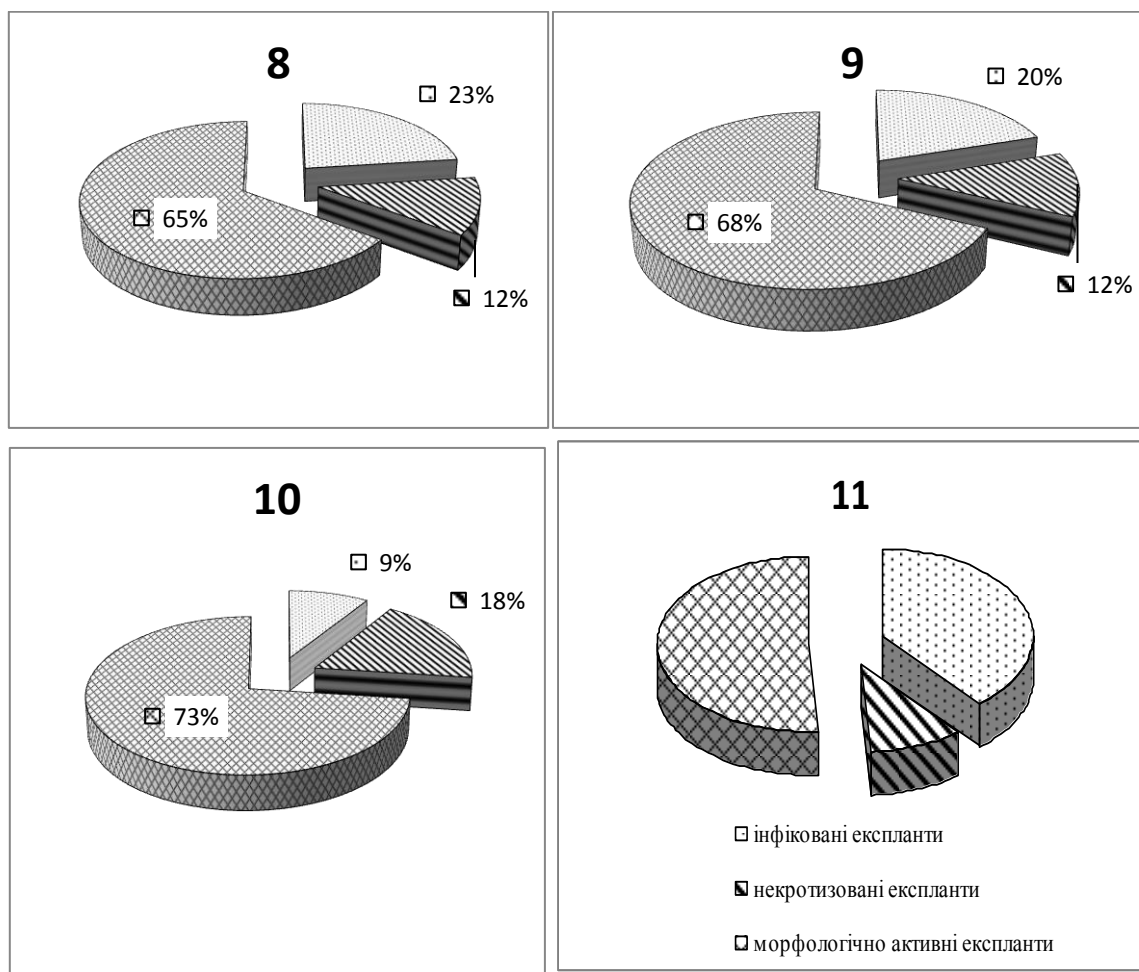
У варіантах № 8–9 у разі збільшення часу дії етанолу від 1 до 2 хв. та витримування на середовищі MS із додаванням антибіотика протягом однієї доби не було виявлено значних відмінностей. Частка експлантів із життєздатними тканинами становила 65 та 68 %, інфікованих – 23 та 20 % відповідно, некротизованих – по 12 %. У разі дії перекису водню й етанолу протягом 1 хв., нітрату срібла 2 хв. та збільшення часу перебування на середовищі з антибіотиком до 2 діб кількість пророслих бруньок збільшилася до 73 %, зменшилася кількість інфікованих експлантів до 9 %, частка некротизованих становила 18 % (варіант № 10).



**Рис. 4 – Ефективність стерилізації *Juglans regia* L. нітратом срібла ( $AgNO_3$ ) (дослід № 1, номер варіантів відповідно до рис. 1)**



**Рис. 5 – Ефективність стерилізації *Juglans regia* L. Лізоформіном-3000 (дослід № 2, номер варіантів відповідно до рис. 2)**



**Рис. 6 – Ефективність стерилізації експлантів *Juglans regia* L. з додаванням антибіотика в поживне середовище MS (дослід № 3, номер варіантів відповідно до рис. 3)**

У варіанті № 11 зменшення тривалості експозиції стерилізаторів (етанол – 0,5 хв., нітрат срібла – 0,5 хв., перекис водню – 0,5 хв.) та витримка на середовищі з антибіотиком протягом доби призвели до збільшення частки інфікованих рослин (39 %) і зменшення некротизації клітин. Це свідчить про недостатній вплив хімічних речовин протягом 0,5 хв. і антибіотика протягом однієї доби в такій комбінації.

Під час пересаджування на поживне середовище MS без додавання антибіотика прояву внутрішньої інфекції не виявляли, тобто використання Цефотаксиму сприяло подоланню бактеріального ураження тканин горіха волоського (дослід № 3).

У нашому дослідженні додавання антибіотика після основних етапів стерилізації до середовища підвищило вихід стерильних експлантів горіха волоського. Такий режим сприяє подоланню фенольної інтоксикації та пригніченню розвитку внутрішніх інфекцій.

Однією з проблем розмноження горіха волоського в умовах *in vitro* залишається затримка росту морфологічно активних рослин після стерилізації антибіотиком. Роботи з оптимізації режиму стерилізації для *Juglans regia* L. та дослідження з мікроклонального розмноження кращих форм цього виду тривають.

**Висновки.** Застосування розчину Лізоформіну-3000 після проходження всіх етапів стерилізації є малоєфективним. У варіантах його застосування в різних експозиціях (5–15 хв.) не отримано жодного стерильного експланта.

Застосування нітрату срібла ( $\text{AgNO}_3$ ) як основного стерилізатора не є доцільним, оскільки при цьому не відбувається подолання внутрішньої інфекції, а некротизація мікропагонів горіха волоського триває.

Найбільшу частку стерильних і життєздатних експлантів (73 %) отримано у варіанті стерилізації нітратом срібла 1 % (2 хв.) та витримуванні на поживному середовищі з додаванням антибіотика Цефотаксим (400 мг/л) протягом двох діб.

Найперспективнішим методом стерилізації рослинного матеріалу *Juglans regia* L. виявився режим із додаванням антибіотика Цефотаксим.

#### ПОСИЛАННЯ – REFERENCES

- Butenko, R. G. 1986. Plant cell culture and biotechnology. Science: 3–20 (in Russian).
- George, F. E., Hall, M. A., G. J. De Klerk. 2008. Plant propagation by tissue culture. The Background, 3(1). Springer, Dordrecht, 501 p.
- Kepek, K. and Kolağasi, Z. 2016. Micropropagation of Walnut (*Juglans regia* L.). Acta Physica Polonica, A., 130(1): 150–156.
- Kushnir, G. P. and Sarnatska, V. V. 2005. Microclonal propagation of plants. Kyiv, Naukova dumka, 272 p. (in Ukrainian).
- Leslie, C. and McGranahan, G. 1992. Micropropagation of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). In: Bajaj, Y. P. S. (eds) High-Tech and Micropropagation II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 18. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 136–150. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-76422-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-76422-6_7)
- Mamchur, V. V. 2017. The genus system *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle. Scientific Bulletin of UNFU, 3: 49–52 (in Ukrainian).
- Mezhenskyi, V. M. 2020. Persian Walnut (*Juglans regia* L.). Kyiv, 533 p. (in Ukrainian).
- Myrselej, M., Sota, V., Kongjika, E. 2020. Reducing oxidative stress on zygotic embryos of walnut (*Juglans regia* L.) under *in vitro* conditions by their pretreatment with ascorbic acid. European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering, 7(1): 23–30.
- Navatel, J. C. and Bourrain, L. 2001. Plant production of walnut *Juglans regia* L. by *in vitro* multiplication. Acta Hort., 544: 465–471. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.544.64>
- Payghamzadeh, K. and Kazemitabar, S. K. 2011. *In vitro* propagation of walnut-A review. African Journal of Biotechnology, 10(3): 290–311.
- Pollegioni, P., Woeste, K., Chiocchini, F., Del Lungo, S., Ciolfi, M., Olimpieri, I. et al. 2017. Rethinking the history of common walnut (*Juglans regia* L.) in Europe: Its origins and human interactions. PLoS ONE 12(3): e0172541. doi:10.1371/journal.pone.0172541
- Shchepotiev, F. L. 1957. Acclimatization of woody plants by methods of remote hybridization and directed education. Botanical Institute, 5: 111–130 (in Russian).
- Shchepotiev, F. L. 1964. Breeding of Persian walnut for winter hardiness and high quality of fruits in Ukraine. Selection, introduction and seed production of woody forest species, p. 23–34 (in Russian).
- Skorobogaty, A. F. 1936. Prospects for breeding Persian walnut and the expansion of its culture in Ukraine and similar regions of the RSFSR. Fruit crops, p. 135–141 (in Russian).
- Titarenko, T. E. 2009. Reproduction of Bukovynian varieties of Persian walnut. Gardening, 62: 58 (in Ukrainian).
- Yermolenko, A. P. 1935. To the selection of Persian walnut. Garden and market garden, 2: 24–26 (in Ukrainian).
- Yermolenko, A. P. 1936. On the selection of winter-hardy and fast-growing forms of seedlings of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Collection of works on selection and physiology of tree species. Kyiv, Poltava, p. 9–4 (in Ukrainian).

Ryzhenko T. S.

OPTIMIZATION OF EXPLANT STERILIZATION MODE FOR *JUGLANS REGIA* L.

Ukrainian Research Institute of Forestry and Forest Melioration named after G. M. Vysotsky

The paper outlines the results of experiments on sterilization of Persian walnut (*Juglans regia* L.) explants using various chemicals. The study was conducted in the laboratory of microclonal propagation in URIFFM. The material was selected in Kharkiv, from one plant from January through April. As primary explants, fragments of woody shoots 1–2 cm long were used. As the main sterilizing substances we used: Lysoformin-3000, silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>), antibiotic Cefotaxime. The viability of the introduced explants was assessed after 25 days. The results of the studies indicate that the use of Lysoformin-3000 as a sterilizing agent was not effective. Silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) did not help to fight the internal infection with a subsequent necrotization of the walnut micro shoots. Regarding the use of the Cefotaxime antibiotic in the nutrient medium (MS without modifications), it showed a positive result in fighting phenolic intoxication and infection in Persian walnut explants.

**К е у w o r d s :** micropropagation, sterilizers, *in vitro*, reproduction.

E-mail: [tania05051995@outlook.com](mailto:tania05051995@outlook.com)

Одержано редакцією 06.08.2021