



М. М. Лисовий

Національний лісотехнічний університет України, м. Львів, Україна

ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ *LARIX DECIDUA* MILL. В УМОВАХ *IN VITRO*

Проведено огляд та аналіз літературних джерел, які стосуються розмноження *Larix decidua* Mill. в умовах *in vitro*. Охарактеризовано господарську цінність досліджуваного виду та обґрунтовано доцільність проведення запланованих досліджень. Наведено перелік найпоширеніших в озелененні декоративних форм модрина європейської. Детально висвітлено застосовану методику проведення експериментальних досліджень з отримання асептичної культури *Larix decidua* Mill. під час розмноження *in vitro*: способи стерилізації лабораторних приміщень та інструментів; хімічні реактиви, їх концентрації та комбінації, якими виконували деконтамінацію вихідних експлантів. Протестовано низку схем стерилізації експлантів модрина європейської із застосуванням як одного хімічного агента, так і різних їх комбінацій. Встановлено необхідність першочергового обробітку досліджуваних експлантів розчином етанолу, що значно знижує кількість контамінованого рослинного матеріалу. Визначено оптимальну схему проведення ступінчастої стерилізації вихідних експлантів *Larix decidua* Mill. для розмноження *in vitro*, яка полягає у почерговому обробітку такими агентами: C₂H₅OH (70 %, 10 с); протічна вода з детергентом – 3 год; NaClO (50 %, 5 с); C₂H₅OH (70 %, 5 с); AgNO₃ (0,2 %, 10 секунд). Узагальнено та проаналізовано отримані результати.

Ключові слова: *Larix decidua* Mill.; *in vitro*; експлант; деконтамінація; живильне середовище.

Вступ. Модрина європейська (*Larix decidua* Mill.) – це дерево заввишки 30-45 (50) м із середньозбіжистим, прямим стовбуром (100-150 см у діаметрі) та вузькою конічною формою крони (Shovhan, 2002). Досліджуваний вид є об'єктом лісокультурної справи України вже понад 200 років, який у разі штучного введення у лісові культури здатен швидше формувати значні запаси деревини та, у перспективі, може бути вагомим резервом підвищення продуктивності наших лісів (Debryniuk, 1993; 2010). Варто відзначити цінність модрина європейської для садово-паркового господарства, завдяки її стійкості до урбанізованих умов та наявності численних декоративних форм: 'Barabits'; 'Cerviconis'; 'Cherry Valley'; 'Conica'; 'Compacta'; 'Corley'; 'Darling Susie'; 'Fastigiata'; 'Globosa'; 'Himmel Broom'; 'Julian's Weeper'; 'Kellermanii'; 'Království'; 'Karsten'; 'Kornik'; 'Krejci'; 'Lakatos Gömb'; 'Lanarck'; 'Liliput'; 'Multicaulis'; 'Paper Lanterns'; 'Pendula'; 'Pendulina'; 'Pit van Geet'; 'Puli'; 'Pyramidalis'; 'Repens'; 'Spacek'; 'Virgata'; 'Breburda'; 'Glauca'; 'Laxa'; 'Little Bogle'; 'Lombarts'; 'Nukmitz'; 'Paula'; 'Pesek'; 'Autumn Gold Weeping'; 'Curvifolia'; 'Deborah Waxman'; 'Horstmann Recurved'; 'Jabkenice-Pospisil'; 'Lucek'; 'Nana'; 'Pelesany'; 'Varied Directions'; 'Alba'; 'Rosiflora'; 'Rubra'; 'Viridiflora'; 'Sulphurea'; 'Almrauschhütte'; 'Balatka'; 'Bingman'; 'Cizkov'; 'Compact Gem'; 'CroxbyBroom'; 'Cyclone Ridge No.1 та No.2'; 'Dablice'; 'Dunkeld'; 'Elefant'; 'Feldschlösschen'; 'Fredstejn'; 'Georgengarten'; 'Gita'; 'Globosa Poplze'; 'Gossard Broom'; 'Grossglockner'; 'Grott'; 'Horstmann Wäest'; 'Janous'; 'Kadan'; 'Kadlecův Mlýn'; 'Kozin'; 'Maly'; 'Marta Radek'; 'Mercedes'; 'Minipendula'; 'Ni-

ederthail'; 'Pecha Krivoklad'; 'Pine Glenn'; 'Procumbens'; 'Pruhonice'; 'Pulkrabek'; 'Recan'; 'Repens Fritsche'; 'Roman'; 'Roubicek'; 'Rotzen'; 'Sazava'; 'Schwarzenburg'; 'Selajoch' (Navrylyuk, Guz & Lisoviy, 2013a, 2013b).

Враховуючи наведені особливості та цінність досліджуваного виду, можна зробити висновок про актуальність удосконалення сучасних методик його відтворення, до яких належить і мікроклонування. Цей метод має низку переваг перед традиційними способами розмноження: отримання оздоровленого, безвірусного садивного матеріалу, можливість намножити потребу кількість рослин із одного вихідного експланта тощо (Mikroklonalnoe rozmnozhenie, 2016; Polishchuk, 2015).

Огляд літератури. Мікроклонування досліджуваного виду здійснювала низка вчених, але варто виокремити тих, які провели повний цикл мікророзмноження. Зокрема, J. Ziuka та S. Kuusienė (2006) для мікроклонування розмноження модрина європейської у ролі експлантів використовували невеликі сегменти молодих пагонів із пазушними бруньками, які заготовлені із 40-річних дерев. Їх стерилізували 75 %-м етанолом (3 хв) та 0,1 %-м розчином нітрату срібла. Культивування проводили на живильному середовищі MS, модифікованому такими фітогормонами: абсцисова кислота; ауксини (ІОК; 2,4-D); цитокініни (кінетин; 6-БАП); гібериліни (гіберилінова кислота). Встановлено, що абсцисова кислота негативно впливала на органогенез вегетативних бруньок. Ауксини також пригнічували ріст експлантів на 25 день спостережень, але на 75-й день виявлено тенденцію до розвитку пагонів. Найпозитив-

Цитування за ДСТУ: Лисовий М. М. Особливості отримання асептичної культури *Larix Decidua* Mill. в умовах *in vitro*. Науковий вісник НЛТУ України. 2017. Вип. 27(4). С. 52–55.

Citation APA: Lisoviy, M. M. (2017). Some Features of Obtaining Aseptic Culture of *Larix Decidua* Mill. *in vitro*. Scientific Bulletin of UNFU, 27(4), 52–55. <https://doi.org/10.15421/40270411>

ніший ефект цитокінінів встановлено у експлантів, які культивували у темноті (Ziauka & Kuusienė, 2006). V. Chalupa (2004) дослідив вплив джерела експлантів, віку материнського дерева, складу живильного середовища та фітогормонів на розмноження модрина європейської в умовах *in vitro*. Сегменти пагонів стерилізували 7,5 %-м гіпохлоридом натрію (20 хв) та 0,1 %-м хлоридом ртуті (20-30 хв). Насінини стерилізували тільки хлоридом ртуті (20-40 хв), після чого з них добували зародки і пасажували на живильне середовище. У ролі середовищ застосовано такі типи: WPM, BTM, MS, QL та GD, які модифікували кількома фітогормонами: BAP, BPA, TDZ, IBA, NAA. Культивування проводили за стандартною методикою. Вкорінення рослин-регенерантів змінювалось серед клонів у межах 47-83 % (Chalupa, 2004). А.М. Diner та ін. (1986) у ролі експлантів застосовували ювенільні тканини з молодих сіянців та насіння. Стерилізацію виконували з допомогою 30 %-го пероксиду водню в два етапи тривалістю 6 год, після чого експланти висаджували на агаризоване (2 %) живильне середовище у чашки Петрі. Ініціацію проводили протягом двох тижнів на середовищі BLG із додаванням цитокініну (BA). Після цього отримані пагони пасажували на три різні живильні середовища: LP, LMG та GD 1/2. Через 16 тижнів культивування утворювались пагони (понад 1 см завдовжки), частина із яких укорінювались (Diner, Strickler, Karnovsky, 1986).

Матеріали та методи дослідження. Усі дослідження з отримання стерильної культури модрина європейської проведено у лабораторії культури тканин кафебри лісових культур і лісової селекції НЛТУ України (2012-2016 рр.) за загальноприйнятими методиками (Kalinin, Kushnir & Sarnackaja, 1992). У ролі маточних обрано молоді рослини досліджуваних видів, вирощені із насіння у відкритому ґрунті (віком 5-7 років). У ролі експлантів використано бічні та верхівкові вегетативні бруньки, які заготовляли навесні у період активної вегетації.

Отримання асептичної культури є першим і вкрай важливим етапом мікроклонального розмноження рослин, тому всі роботи потрібно виконувати у максимально стерильних умовах. Поверхні та стаціонарне обладнання лабораторії обробляли 96 %-м етанолом та перед кожним проведенням робіт виконували стерилізацію ультрафіолетовими бактерицидними лампами упродовж 1,5-2,0 год. Дезінфекцію інструментів виконували сухим жаром у сушильній шафі за температури 160-180 °C (1,0-1,5 год), а перед кожною маніпуляцією із пасажу експлантів обробляли їх 96 %-м етанолом, фламбували над спиртівкою та промивали стерильною дистильованою водою.

Для деконтамінації вихідних експлантів модрина європейської застосовано ступінчасту схему стерилізації, яка полягала у почерговому обробітку рослинного матеріалу такими стерилізаційними агентами різної концентрації та у різних їх комбінаціях: протічна вода (H₂O) з детергентом (для підвищення ефективності дії якої додавали емульгатор "Твін 80" (Debryniuk, 2010; Kalinin, Kushnir & Sarnackaja, 1992)); медичний етиловий спирт (C₂H₅OH); гіпохлорид натрію (NaClO); та

нітрат срібла (AgNO₃). Після кожного реактиву експланти тричі промивали стерильною дистильованою водою у всіх варіантах дослідів упродовж 4-5 хв. Для подолання внутрішніх інфекцій, застосовували 0,1 %-й водний розчин антибіотика "Іманін" (Imaninum), яким обробляли вихідний експлант безпосередньо перед пасажем.

Простерилізовані експланти пасажували на живильне середовище за рецептом MS (Murashige and Skoog) без фітогормонів та проводили спостереження упродовж 10-15 діб. Після цього, експланти класифікували на три групи: асептичні (стерильні), заражені патогенами (інфіковані) та некротичні (пошкодженні хімічними агентами високої концентрації).

Результати дослідження. Для достовірності отриманих результатів, кожен варіант досліду проводили у трикратній повторності. За період проведення досліджень протестовано низку схем стерилізації експлантів модрина європейської із застосуванням як одного хімічного агента, так і їх різноманітних поєднань. Встановлено, що найдоцільніше, для досягнення поставленої мети, використовувати ступінчасту стерилізацію. Результати деконтамінації вихідного рослинного матеріалу досліджуваного виду були досить варіабельними, що, на нашу думку, залежало від застосованих стерилізаційних реагентів та їх концентрації (рис., табл.).

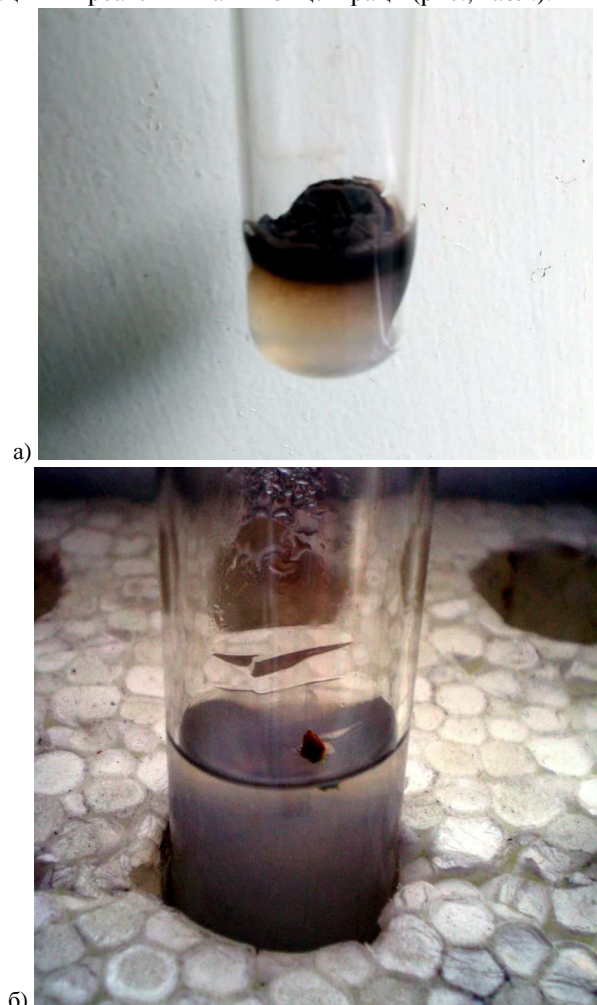


Рис. Експланти модрина європейської: а) контамінований; б) асептичний

Табл. Результати деконтамінації експлантів модрина європейської

№ з/п	Застосований стерилант (у послідовності використання)								Отримано експланти, %			
	C ₂ H ₅ OH*		H ₂ O + детергент	NaClO		C ₂ H ₅ OH		AgNO ₃		контаміновані	асептичні	некротичні
	концентрація, %	експозиція, сек.	експозиція, год.	концентрація, %	експозиція, хв.	концентрація, %	експозиція, сек.	концентрація, %	експозиція, хв.			
1		–		30		50		0,1		64	36	–
2	–	–		50		70	5	0,2		57	43	–
3		–		70		96		0,3		52	40	8
4		5		30		–		0,1		42	58	–
5	50	10		50		–	–	0,2		34	65	1
6		15		70		–		0,3		25	44	31
7		5	3	30	5	50		0,1	10	23	77	–
8	70	10		50		70		0,2		4	96	–
9		15		70		96		0,3		5	87	8
10		5		30		50	5	0,1		6	65	29
11	96	10		50		70		0,2		3	50	47
12		15		70		96		0,3		–	43	57

* Застосовували до початку виділення меристем (розбирання бруньок).

Отримані результати свідчать, що відсутність першочергового обробітку експлантів етанолом (варіанти досліду № 1-3) забезпечила найбільшу кількість контамінованих експлантів – 52-64 %. Також важливе значення має концентрація C₂H₅OH на цьому етапі, зокрема у варіантах № 10-12 (96 %) спостерігали найбільшу частку некротичних експлантів – 29-57 %, проте зараженого рослинного матеріалу тут було найменше. Найбільшу кількість стерильних експлантів отримано у варіантах досліду № 8 та 9-96 і 87 % відповідно.

Висновки. Унаслідок проведених досліджень можна зробити висновок про пряму залежність застосованих хімічних агентів та їх концентрацій на результати стерилізації вихідного рослинного матеріалу *Larix decidua* Mill. під час розмноження *in vitro*. Найбільшу кількість асептичних експлантів (96 %) забезпечила така схема деконтамінації: C₂H₅OH (70 %, 10 с); протічна вода з детергентом – 3 год; NaClO (50 %, 5 с); C₂H₅OH (70 %, 5 с); AgNO₃ (0,2 %, 10 секунд).

Перелік використаних джерел

Chalupa, V. (2004). *in vitro* propagation of European larch (*Larix decidua* Mill.). *Journal of Forestry Science*, 50(12), 553–558.
 Debryniuk, Yu. M. (1993). Perspektyvy vykorystannia modryny yevropeiskoi dlia pidvyshchennia produktyvnosti lisiv Ukrainy. *Ukrainskyi lis*, 2, 36–37. [in Ukrainian].
 Debryniuk, Yu. M. (2010). Tekhnolohichni aspekty stvorennia i vyroshchuvannia plantatsiinykh lisovykh kultur za uchastiu modryny ta yalyny u Zakhidnomu rehioni Ukrainy. *Naukovi pratsi*

Lisivnychoi akademii nauk Ukrainy: zb. nauk. prats, 8, 59–64. Lviv: NLTU Ukrainy. [in Ukrainian].

Diner, A. M., Strickler, A., & Karnovsky, D. F. (1986). Initiation, elongation, and remultiplication of *Larix decidua* micropropagules. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 16(3), 306–318.
 Havrylyuk, V. M., Guz, M. M., & Lisoviy, M. M. (2013a). Polymorphic of larch European and the prospects for its use in landscaping. *Scientific Bulletin of UNFU*, 23(13), 15–20. Retrieved from: http://nltu.edu.ua/nv/Archive/2013/23_13/15_Gaw.pdf. [in Ukrainian].
 Havrylyuk, V. M., Guz, M. M., & Lisoviy, M. M. (2013b). Features of an vaccination of morphological form of larch European. *Scientific Bulletin of UNFU*, 23(12), 53–58. Retrieved from: http://nltu.edu.ua/nv/Archive/2013/23_12/53_Gaw.pdf. [in Ukrainian].
 Kalinin, F. L., Kushnir, G. P., & Sarnackaja, V. V. (1992). *Tehnologija mikroklonalnogo rozmnozhenija rastenij: monografija*. Kyiv: Nauk. dumka, 232 p. [in Russian].
 Mikroklonalnoe rozmnozhenie. (2016). Mikroklonalnoe rozmnozhenie i ozdorovlenie rastenij. Retrieved from: http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell6_1.htm. [in Russian].
 Polishchuk, I. V. (2015). Robotyzovana systema dlia mikroklonalnoho rozmnozhenia roslyn *in vitro*. Retrieved from: <http://www.icozfs.net/infocom2015/robotizovana-sistema-dlya-mikroklonalnogo-rozmnozheniya-roslyn-in-vitro>. [in Ukrainian].
 Shovhan, A. D. (2002). *Holonasinni: praktykum z dendrolohii*. Lviv: UkrDLTU, 122 p. [in Ukrainian].
 Ziauka, J., & Kuusienė, S. (2006). Changes in Development of European Larch (*Larix decidua* Mill.) Vegetative Buds Induced by Plant Hormones. *Baltic Forestry*, 12(2), 141–150.

Н. Н. Лисовий

Національний лесотехнічний університет України, г. Львів, Україна

ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ АСЕПТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ *LARIX DECIDUA* MILL. В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Проведен обзор и анализ литературных источников, касающихся размножения *Larix decidua* Mill. в условиях *in vitro*. Представлена характеристика хозяйственной ценности исследуемого вида и обоснована целесообразность проведения запланированных исследований. Приведен перечень наиболее распространенных в озеленении декоративных форм лиственницы европейской. Подробно описана примененная методика проведения экспериментальных исследований по получению асептической культуры *Larix decidua* Mill. при размножении *in vitro*: способы стерилизации лабораторных помещений и инструментов; химические реактивы, их концентрации и комбинации, которыми выполняли деконтаминацию исходных экплантов. Протестировано ряд схем проведения стерилизации экплантов лиственницы европейской с применением как одного химического агента, так и различных их комбинаций. Установлена необходимость первоочередной обработки экплантов раствором этанола, что значительно снижает количество контаминированного растительного материала. Определена оптимальная схема проведения ступенчатой стерилизации экплантов *Larix decidua* Mill. для размножения *in vitro*, которая заключается в постепенной обработке следующими химическими агентами: C₂H₅OH (70 %, 10 с) проточная вода с моющим средством – 3 ч; NaClO (50 %, 5 с) C₂H₅OH (70 %, 5 с) AgNO₃ (0,2 %, 10 с). Обобщены и проанализированы полученные результаты.

Ключевые слова: *Larix decidua* Mill.; *in vitro*; экплант; деконтаминация; питательная среда.

SOME FEATURES OF OBTAINING ASEPTIC CULTURE OF *LARIX DECIDUA* MILL. IN VITRO

Larix decidua Mill. is the subject of forestry in Ukraine for more than 200 years, which is administered in artificial forest plantations able to generate more quickly large timber reserves and in the future can be a significant reserve to increase productivity of our forests. For reproduction of larch we used micropropagation because this method has several advantages over traditional breeding methods. To conduct the research the authors used conventional methods in biotechnology. As explants we used lateral and apical vegetative buds that are harvested in the spring during the active growing season of the young plants. For decontamination of explants of *Larix decidua* step scheme of sterilization was applied using these agents in various combinations and concentrations: H₂O + detergent + "Tween 80"; C₂H₅OH; NaClO; AgNO₃. In order to overcome internal infections we used 0.1 % aqueous solution of antibiotic Imaninum. Sterilized explants were placed on a nutrient medium Murashige and Skoog without phytohormones. For the reliability of the results of experiments were conducted in the triple repetition. The results of the research are as follows. Firstly we revealed that no priority dipping of explants in ethanol had provided the largest number of infected explants – 52-64 %. Then, in embodiments where C₂H₅OH (concentration 96 %) was used, we observed the greatest number of necrotic explants – 29-57 %, but the infected plant material, there was the least. Finally, the largest numbers of sterile explants were obtained in variants experiment with average concentrations of sterilizing agents. Thus, we can conclude that there is a direct relationship between applied chemical agents and their concentration on results of sterilization of plant material *Larix decidua* in reproduction *in vitro*. The largest number of aseptic explants (96 %) provided a decontamination of following scheme: C₂H₅OH (70 %, 10 seconds); water with detergent – 3 hours; NaClO (50 %, 5 seconds); C₂H₅OH (70 %, 5 seconds); AgNO₃ (0.2 %, 10 seconds).

Keywords: *Larix decidua* Mill.; *in vitro*; explants; decontamination; the nutritious environment.

Інформація про автора:

Лісовий Микола Миколайович, канд. с.-г. наук, доцент, докторант, Національний лісотехнічний університет України, м. Львів, Україна. **Email:** mlisovij@gmail.com