

**ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ ЛОХИНИ
ВИСОКОРОСЛОЇ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)**

І. М. Бобошко-Бардин, кандидат сільськогосподарських наук

А. А. Портянко, магістр другого року навчання*

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mails: i_boboshko@nubip.edu.ua, portankoandrij@gmail.com

Анотація. Останнім часом активізувалися роботи з розмноження деревних рослин методом культури тканин. Лохина високоросла (*Vaccinium corymbosum* L.) за останні роки здобула велику популярність у садівництві. У цьому контексті особливо актуальними є дослідження з удосконалення окремих етапів мікроклонального розмноження, зокрема таких як: відбір експлантів, отримання стерильної культури, стимулювання морфогенезу, адаптація регенерантів тощо. Метою досліджень було оцінити ефективність застосування для асептування таких розчинів стериліантів як: аргентум нітрат (1% AgNO_3); натрій хлорит (2,5% NaClO); хлорид ртуті (0,1% HgCl_2). Найефективнішою технологією стерилізації експлантів лохини високорослої є ступінчаста стерилізація розчинами реагентів у такій послідовності: мильний розчин (30 хв.); 70 % етанол (1 хв.); 1 % нітрат срібла (10 хв.); 2,5 % натрій гіпохлорит (10 хв.). За результатами такої стерилізації було отримано 65 % неінфікованих, життєздатних експлантів лохини високорослої. Дослідження показали, що розроблена і апробована методика ступінчастої стерилізації експлантів з метою введення їх у культуру *in vitro* є значно ефективнішою від раніше застосовуваних і тому заслуговує на впровадження у практику.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, асептична культура, експлант, стерилізація.

Актуальність. Лохина високоросла (*Vaccinium corymbosum* L.) останніми роками набула неабиякої популярності не тільки у садівництві, а й у сфері озеленення. За належного догляду лохина високоросла має декоративний вигляд та їстівні плоди [2, 3, 5]. Ця культура займає лідируючі позиції в садових центрах за обсягами реалізації, внаслідок чого у розсадництві актуалізувалися питання щодо розробки та вдосконалення технології її розмноження.

* Науковий керівник – кандидат сільськогосподарських наук І. М. Бобошко-Бардин

Аналіз актуальних досліджень та публікацій. Широкого використання набуло мікроклональне розмноження цього виду, яким вже давно і успішно займаються білоруські, польські та американські виробники [6, 10]. Мікроклональне розмноження лохини високорослої (*Vaccinium corymbosum* L.) дасть змогу вирощувати рослини цього виду у великих масштабах за короткий термін зі збереженням всіх якостей материнської рослини [7, 8].

Основними перевагами методу мікроклонального розмноження є [1]:

- високий коефіцієнт розмноження;
- економія площі в процесі вирощування;
- оздоровлення садивного матеріалу від різного роду інфекцій та хвороб;
- отримання генетично ідентичного матеріалу.

Метою досліджень було удосконалення методики отримання асептичної культури лохини високорослої (*Vaccinium corymbosum* L.).

Головне завдання досліджень – оцінити ефективність застосування для асептування експлантів рослини донора різних розчинів стериліантів.

Матеріали та методи досліджень. Вихідний матеріал лохини високорослої (*Vaccinium corymbosum* L.) було ретельно відібрано з рослин донорів, які зростали на території центру садівництва «АртВіль». Під час відбору рослин значну увагу було приділено їх зовнішньому вигляду – формі та розміру листової пластини й бруньок, довжині та діаметру пагонів, забарвленню листків та пагонів, а також наявності механічних пошкоджень, шкідників і збудників хвороб. За зазначеною методикою було відібрано здорові живці, які слугували вихідним матеріалом для заготівлі експлантів (рис. 1), необхідних для проведення запланованих експериментальних досліджень.

Мікроклональне розмноження рослин передбачає розмноження в асептичних умовах і включає в себе декілька етапів: стерилізацію вихідного матеріалу, введення його в культуру *in vitro*, морфогенез та адаптація до умов *in vivo* [4].



Рис. 1. Нарізані пагони Лохини високорослої 'Нельсон' (*Vaccinium corymbosum* 'Nelson') в безлистяному стані (фото автора)

Стерилізація вихідного рослинного матеріалу є найважливішим етапом мікроклонального розмноження. На основі опрацьованої літератури для стерилізації вихідного матеріалу було обрано розчини таких стериліантів: аргентум нітрат (1% AgNO_3); натрій хлорит (2,5% NaClO); хлорид ртуті (0,1% HgCl_2) [7, 9, 10].

Асептування вихідного матеріалу експлантів лохини високорослої 'Нельсон' (*Vaccinium corymbosum* 'Nelson') проводили за послідовністю, визначеною загальноприйнятою методикою [9, 10], з використанням різних модифікацій стерилізуючих розчинів:

1. Відмивання експлантів у мильному розчині упродовж 30 хв., для ліквідації забруднення;
2. Промивання експлантів під проточною водою упродовж 20 хв. з метою відмивання залишків мильного розчину;
3. Занурення вихідного матеріалу в 70%-й розчин етилового спирту на 1 хв., для зняття воскового нальоту;

4. Стерилізація експлантів у розчинах натрій гіпохлорид 2,5% NaClO, аргентум нітрат (1% AgNO₃) і хлорид ртуті (0,1% HgCl₂) (рис. 2, табл. 1);
5. Промивання в стерильній воді;
6. Висаджування на стерильне середовище Мурасіге-Скуга (рис. 3).



Рис. 2. Загальний вигляд експлантів у апробованих стерилізуючих розчинах (фото автора)

1. Варіанти розчинів стериліантів, їх концентрація та експозиція асептування експлантів Лохини високорослої ‘Нельсон’ у досліді

Варіант (назва стериліанта)	Експлікація, хв.	Кількість відмивань дистильованою водою по 7 хв.
I. Аргентум нітрат (1%AgNO ₃)	15	3
II. Натрій хлорит (2,5%NaClO)	15	3
III. Хлорид ртуті (0,1%HgCl ₂)	15	5
IV. Натрій хлорит + аргентум нітрат (2,5%NaClO + 1%Ag NO ₃)	10+10	2+3



Рис. 3. Загальний вигляд експлантів введених в культуру *in vitro* (фото автора)

У процесі стерилізації на стандартне живильне середовище Мурасіге-Скуга було висаджено 80 експлантів з однією-двома вегетативними бруньками (20 штук по кожного з варіантів). Всі екземпляри на 4 тижні перемістили до стерильної термальної кімнати з температурою повітря + 22 °С. На 5, 7 та 21 день проводили перевірку рослин на предмет зараження патогенною мікрофлорою і в разі її виявлення – вилучали вражені екземпляри для запобігання зараженню інших рослин.

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами досліджень, метою яких була апробація стериліантів для отримання асептичної культури лохини високорослої, надзвичайно низькою виявилась ефективність використання як стерилізуючого розчину хлориду натрію (NaClO) з концентрацією 2,5 % (варіант II), оскільки за його використання всі експланти, без винятку, були уражені патогенною мікрофлорою (рис. 5а). Цей факт свідчить про доцільність апробації ефективності використання або поєднання для стерилізації розчинів інших препаратів.

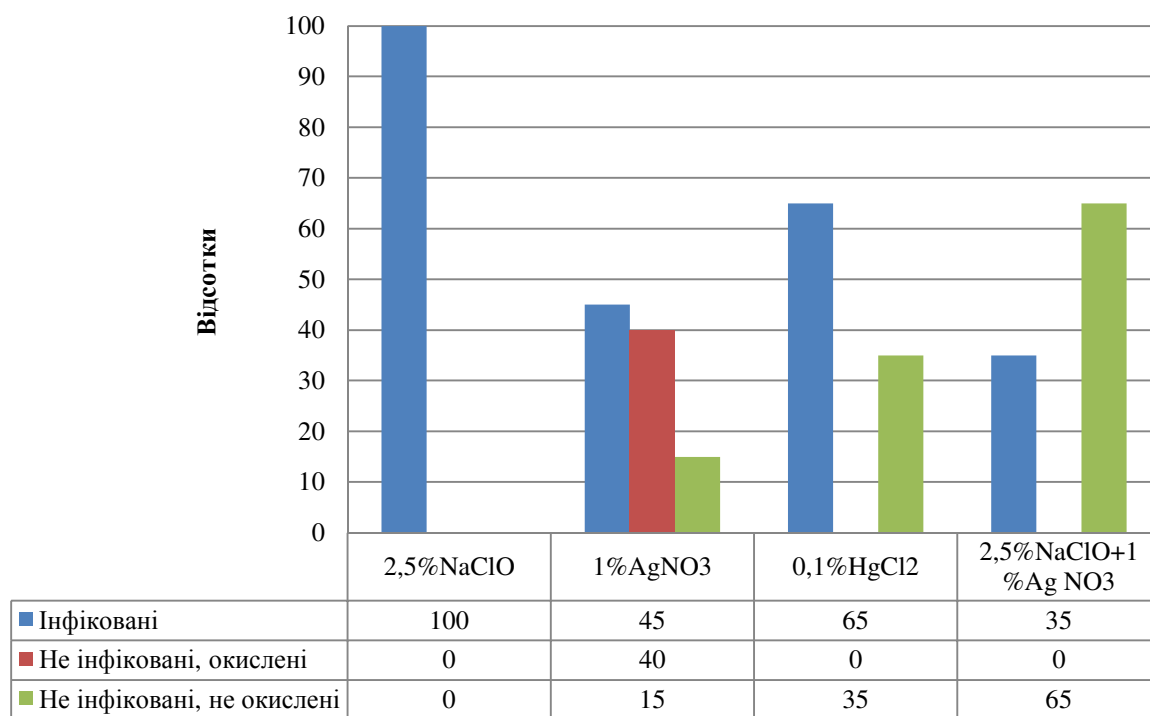
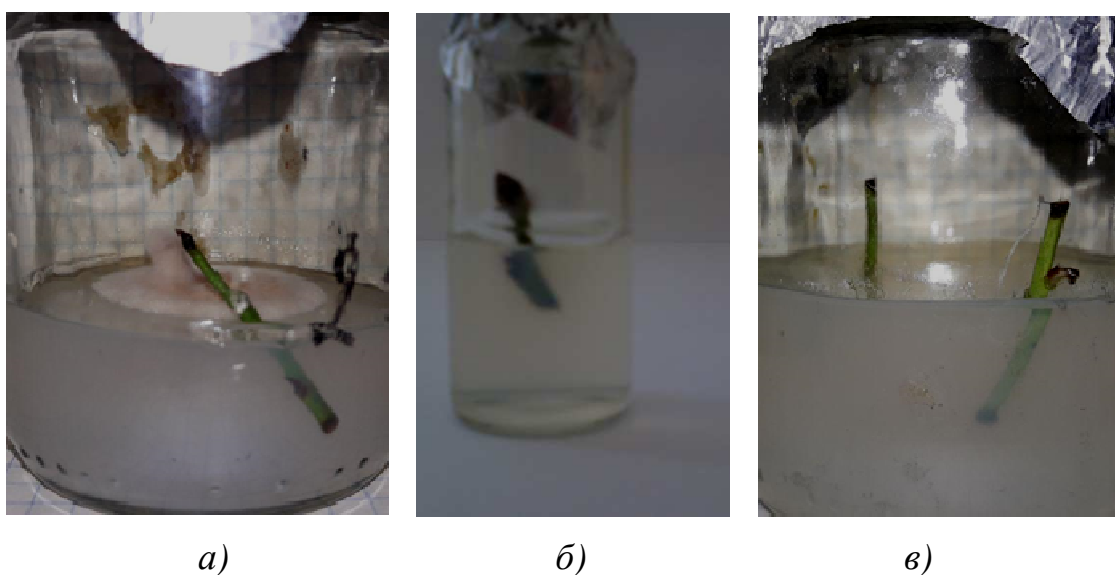


Рис. 4. Ефективність апробованих в експерименті варіантів (розчинів) стерилізації експлантів Лохини високорослої ‘Нельсон’

Питома частка незаражених експлантів по II та III варіанту з використанням для стерилізації розчину аргентум нітрат (1% AgNO_3) та хлорид ртуті (0,1% HgCl_2) становило 15 і 35 % відповідно (рис. 4).



**Рис. 5. Загальний вигляд експлантів (*Vaccinium corymbosum* L.):
а) інфікований; б) не інфікований, окислений; в) життєздатний
(фото автора)**

Найбільшим відсотком експлантів з ознаками некрозу (40 %) вирізнявся варіант I з використанням 1% розчину аргентум нітрат (рис. 5б), що свідчить про токсичність даного розчину стериланту для експлантів, яка, значною мірою, зумовлювала їх загибель.

Водночас, отримані результати вказують, що підвищення ефективності асептування експлантів можна досягнути за рахунок використання ступінчатої стерилізації, яка включає в себе загальноприйнятну методику з послідовною обробкою експлантів дослідної рослини стерилізуючими розчинами 2,5 % хлориду натрія (NaClO) та 1% нітрату срібла (AgNO_3) за такою схемою:

- відмивання у мильному розчині 30 хв.;
- відмивання у проточній та дистильованій воді 20 хв.;
- 70 % етанол на 1 хвилину;
- 1 % розчин нітрату срібла (AgNO_3) з часом експозиції 10 хв.;
- відмивання у стерильній дистильованій воді 2 хв.;
- 2,5 % розчин натрія гіпохлорит (NaHClO) 10 хв.;
- відмивання стерильною дистильованою водою тричі по 3 хв.;
- висаджування на живильне середовище Мурасіге та Скуга.

За використання цієї схеми стерилізації вдалося досягнути високого відсотку (65 %) отримання стерильних життєздатних експлантів лохини високорослої (рис. 4, 5). Застосовуючи запропоновану ступінчасту стерилізацію нам вдалося підвищити відсоток отриманих асептичних експлантів у середньому на 50 %, порівняно з варіантом II (2,5% натрій хлорид) та 30 % порівняно з варіантом III (0,1 % сулеми).

Проаналізувавши отримані дані за всіма 4 варіантам можна зробити висновок, що потрібно продовжувати підбір інших концентрації розчинів, їх поєднання та експозицію витримки для експлантів лохини високорослої (*Vaccinium corymbosum* L.).

Висновки і перспективи

Підвищення ефективності стерилізації експлантів лохини високорослої можливе за рахунок послідовного використання розчинів стерилантів у оптимізованих для певних видів концентраціях і експозиціях обробітку.

Найкращим вихідним матеріалом для отримання асептичної культури є вегетативні бруньки відібрані восени.

Найбільш ефективною схемою асептування експлантів лохини високорослої (*Vaccinium corymbosum* 'Nelson') є їх ступінчаста стерилізація розчинами реагентів у такій послідовності: мильний розчин (30 хв.); 70 % етанол (1 хв.); 1 % нітрат срібла (10 хв.); 2,5 % натрій гіпохлорит (10 хв.). За результатами даної стерилізації було отримано 65% неінфікованих, життєздатних експлантів лохини високорослої.

Дослідження показали, що розроблена і апробована методика ступінчастої стерилізації експлантів з метою введення її в культуру *in vitro* є значно ефективнішою раніше застосовуваних і тому заслуговує на впровадження у практику.

Список використаної літератури

1. Бобошко-Бардин І. М. Актуальність мікроклонального розмноження та особливості його використання для виробництва садивного матеріалу декоративних рослин. Науковий вісник НУБіП України. 2009. № 135. С. 141–148.
2. Матчет М.Д. Голубика фланоноиды подавляют матричных металлопротеинов деятельность в DU145 клеток человеческого рака простаты. *Биохимия и клеточная биология*. 2005. Том 83. № 5. С. 637–643.
3. Лікарські рослини. URL: <http://likarski-roslini.net.ua/loxina-korist-shkoda/>
4. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин : підручник. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2003. 520 с.
5. Майнланд С. М. Обзор новой информации по основам медицинской помощи о голубике. Седьмой Международный симпозиум по вопросам культуры: материалы симпозиума (Терма-де-Чильян, Чили, 4-9 декабря 2000). Левен: Международное общество по садоводческой науки (МОСН). 2002. С. 39-43.
6. Способы размножения голубики топяной *Vaccinium uliginosum* L. Бордок И. В., Маховик И. В., Моисеева Т. Р., Волкова Н. В. Институт леса НАН

Беларуси, Гомель, Беларусь. URL: <http://asprus.ru/blog/sposoby-razmnozheniya-golubiki-topryanoj-vacciniumuliginosuml/>

7. Reshetnikov V. N., Kilchevskii A. V., Rupasova Zh. A., Filipenia V. L., Chizhik O. V., Gorbatshevich V. I., Ivanovich A. A. (2012). Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Genetic basics of plant selection. Minsk. 2012, Biotechnology in plant selection. Cellular engineering. (Russian). V. 3, P. 347–355.

8. Reshetnikov V. N., Spiridovich E. V., Nosov A. M. Plant biotechnology and perspectives of its development. Genetics and Plant Physiology. 2014, 46 (1), P. 3–18. (In Russian).

9. Zhang Zhi Dong, Lopes da Fonseca, L.; Romero Mun oz, F. (2006). Technical system of blueberry micropropagation in China Faculty of Horticulture, [Proceedings of the Eighth International Symposium on Vaccinium Culture, Sevilla, Spain and Oeiras, Portugal], 3–8 May 2006. P. 421–425.

10. Zu Xiao Yan, (2010). Anthocyanins extracted from Chinese blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.) and its anticancer effects on DLD1 and COLO205 cells. [Chinese Medical Journal]. 123 (19). Chinese Medical Association, 2010. P. 2714–2719.

ПОЛУЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)

И. Н. Бобошко-Бардин, А. А. Портянко

Анотация. В последнее время активизировались работы по размножению древесных растений методом культуры тканей. Голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.) за последние годы получила большую популярность в садоводстве. В этом контексте особенно актуальными являются исследования по совершенствованию отдельных этапов микроклонального размножения: отбор эксплантов, их стерилизация, получение асептической культуры, морфогенез и ризогенез, адаптация регенерантов и тому подобное. Программой исследований предусматривалось оценка эффективности применения таких стерилизующих веществ: аргентум нитрат (1% AgNO_3) натрий хлорит (2,5% NaClO) хлорид ртути (0,1% HgCl_2). Наиболее эффективной технологией стерилизации эксплантов голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* "Nelson") является их ступенчатая стерилизация растворами реагентов в такой последовательности: мыльный раствор (30 мин.); 70% этанол (1 мин.); 1% аргентум нитрат (10 мин.); 2,5% натрий гипохлорит (10 мин.). По результатам данной стерилизации было получено 65% неинфицированных, жизнеспособных эксплантов голубики высокорослой. Исследования показали, что разработана и апробирована методика ступенчатой стерилизации эксплантов с целью введения ее в культуру *in vitro* значительно эффективнее ранее применяемых и поэтому заслуживает внедрение в практику.

Ключевые слова: микроклональное размножения, асептическая культура, эксплантов, стерилизация.

OBTAINING ASEPTIC CULTURE OF THE BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)

I. Boboshko-Bardyn, A. Portyanko

Abstract. *Recently, work on the reproduction of woody plants by the method of tissue culture has been intensified. The *Vaccinium corymbosum* L. has become very popular in horticulture in recent years. In this context, studies of improvement individual stages of microclonal propagation are particularly relevant: selection of explants, their aseptics, obtaining a sterile culture, morphogenesis and rhizogenesis, adaptation of regenerants and so on. The research program envisaged the evaluation of the effectiveness of using the following solutions of sterilants: argentine nitrate (1% AgNO₃); sodium chlorite (2.5% NaClO); mercury chloride (0.1% HgCl₂). The most effective technology of explants sterilization of *Vaccinium corymbosum* L. explants is their stepwise sterilization with reagent solutions in the following sequence: soap solution (30 min); 70% ethanol (1 min); 1% argentine nitrate (10 min); 2.5% sodium hypochlorite (10 min.). According to the results of this sterilization, 65% of uninfected, viable tall blueberry explants were obtained. Studies have shown that the developed and tested method of stepwise sterilization of explants with the aim of involving it into culture in vitro is much more effective than previously used and therefore deserves to be put into practice.*

Keywords: *microclonal reproduction, aseptic culture, explant, sterilization.*