ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОТОКОЛУ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ЕКСПЛАНТАТІВ ДЕЯКИХ ЛИСТЯНИХ ДЕРЕВНИХ РОСЛИН У КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

О. Ю. ЧОРНОБРОВ, кандидат сільськогосподарських наук
<https://orcid.org/0000-0002-1330-8878>, e-mail: o_chornobrov@nubip.edu.ua

О. Е. ТКАЧОВА, науковий співробітник
<https://orcid.org/0000-0002-6415-5808>, e-mail: l_tkachova@nubip.edu.ua
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Одним із методів отримання садивного матеріалу листяних деревних рослин, зокрема ясена звичайного (*Fraxinus excelsior* L.), липи широколистої (*Tilia platyphyllos* Scop.) та берези повислої (*Betula pendula* Roth), є мікроклональне розмноження. Асептичність експлантатів – передумова мікроклонального розмноження рослин. Здебільшого для цього використовують хімічну стерилізацію рідкими речовинами. На режим деконтамінації впливає низка чинників, зокрема генотип рослини. Мета дослідження – оптимізація протоколу стерилізації експлантатів *F. excelsior*, *T. platyphyllos* та *B. pendula* для мікроклонального розмноження. Для досліджень використовували 20–30 см частини пагонів, ізольовані із 12-річної *T. platyphyllos*, 10-річної *B. pendula* та 15-річного *F. excelsior* у лютому–березні 2021 р. Рослинний матеріал культивували за загальноприйнятою методикою на живильному середовищі MS (Murashige & Skoog, 1962). Для опрацювання дослідних даних використовували програмні засоби MS Excel, розраховано середнє та його основну помилку. Для аналізу впливу режиму стерилізації експлантатів на асептичність проведено однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA). Показано доцільність витримання рослинного матеріалу упродовж доби у фунгіцидних препаратах, зокрема у 0,1 % розчині «Самшит» – *F. excelsior* та 0,3 % розчині «Фундазол» – *T. platyphyllos* і *B. pendula*. Оптимізовано протокол стерилізації дослідних рослин (ефективність понад 50 %) шляхом використання ступінчастого способу із застосуванням 70 % етилового спирту, 1,0 % і 2,0 % AgNO_3 та 2,5 % і 5,0 % NaClO . Установлено, що вплив режиму стерилізації дослідних рослин на асептичність є статистично значущим на рівні 5 %. Для ініціації експлантатів використовували живильне середовище за прописом MS із додаванням 0,25 мг·л⁻¹ кінетину і 2,0 г·л⁻¹ активованого вугілля. Подальші дослідження спрямовані на розроблення протоколу прямої регенерації мікропагонів рослин *F. excelsior*, *T. platyphyllos* та *B. pendula* за дії компонентів живильного середовища *in vitro*.

Ключові слова: культура тканин рослин *in vitro*, *Fraxinus excelsior* L., *Tilia platyphyllos* Scop., *Betula pendula* Roth, асептичність, експлантати, регенерація, живильне середовище, мікроклональне розмноження.

Актуальність. Одержання високоякісного садивного матеріалу листяних деревних рослин, зокрема ясена звичайного (*Fraxinus excelsior* L.), липи широколистої (*Tilia platyphyllos* Scop.) та берези повислої (*Betula pendula* Roth), є актуальним завданням для лісового і садово-паркового господарства України. Одним із методів отримання

рослин зі збереженням цінних спадкових властивостей є мікроклональне розмноження. Цей метод, на противагу традиційним способам розмноження, дає змогу одержувати оздоровлені генетично-однорідні рослини упродовж року з мінімальної кількості донорного матеріалу та значно збільшити коефіцієнт розмноження

(Butenko, 1964; Lutova, 2003; Smith, 2012). Однією із важливих умов мікроклонального розмноження є підготовка рослинного матеріалу до введення в умови *in vitro*, зокрема добір протоколу ефективної стерилізації (Kalinin et al., 1980; Kataeva & Butenko, 1983). Від стерилізації, як першого етапу, залежить результат мікроклонального розмноження. При цьому необхідно підібрати відповідні стерилізувальні речовини, їх концентрацію та експозицію витримування, які ефективно знешкоджують біоту, водночас не пошкоджують рослинні тканини та дають змогу одержувати високу життєздатність в умовах *in vitro*.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Нині для досягнення асептичності експлантатів використовують хімічну стерилізацію рідкими речовинами, рідше газоподібними, а також фізичні реагенти (ультразвук, ультрафіолетове опромінення) (Butenko, 1964; Kalinin et al., 1980; Kataeva & Butenko, 1983). Аналіз досліджень свідчить, що найбільш поширеною є хімічна стерилізація речовинами, що містять активний хлор (гіпохлорит натрію / кальцію, хлорамін, хлорне вапно), гідраргіум (сулема, етилмеркурхлорид, тімеросал), кисень (пероксид водню), срібло (нітрат срібла), спирти (Shabanova & Mashkina, 2015; Lebedev & Shestibratov, 2016; Podhaietskyi et al., 2016; Shakhov et al., 2018, 2019). Антибіотики використовують для знешкодження ендогенної біоти об'єктів, однак вони характеризуються вибіркоvim спектром дії (Butenko, 1964). Також застосовують біоциди, зокрема PPM (Plant Preservative Mixture™) (Podhaietskyi et al., 2016). Зокрема, автори Lebedev & Shestibratov (2016) частини пагона з 2–3 бруньками, ізольованими із 60-річних плюсових дерев *F. excelsior*, стерилізували у 0,1 % хло-

риду ртуті упродовж 6 хв із наступним триразовим промиванням стерильною дистильованою водою. Рослинний матеріал культивували на живильному середовищі за прописом MS (Murashige & Skoog, 1962) з додаванням ВАР (6-бензиламінопурин) і ІАА (β-індоліл-3-оцтова кислота). Для збільшення відсотка ефективності стерилізації використовували двоступінчасту стерилізацію (Skálová et al., 2012). Автори Rayamnou et al. (2014) оптимізували протокол стерилізації пагонів *T. platyphyllos* із використання мильної води для нейтралізації поверхневого забруднення та застосування попередньої стерилізації, яка складалася із витримування у розчині 600 мг·л⁻¹ аскорбінової кислоти, 4,0 г·л⁻¹ фунгіциді «Captan», 5,0 % комерційному розчині NaOCl (5,0 % Cl) (20 хв). Потім рослинний матеріал промивали під струменем води. Для стерилізації використовували розчин 600 мг·л⁻¹ аскорбінової кислоти і 10 % NaOCl (5 хв). Для стерилізації насіння рослин *Betula spp.* використовували 1,0 % пероксид водню (H₂O₂) (48 год) за T = +4°C, із наступним витримуванням у 30,0 % H₂O₂ (15 хв) та промиванням у стерильній дистильованій воді (Gaidamashvili et al., 2015). Автори Shabanova & Mashkina (2015) стерилізацію експлантатів гібридів *Populus L.* проводили з урахуванням сезону ізоляції. Зокрема пагони, ізольовані у зимовий період, попередньо оброблювали в нестерильних умовах у 2,0 % «Domestos» (10 хв), далі у суміші розчинів 0,025 % мертіолята (10 хв) і 7,0 % «Білизни» (10 хв); експозиція витримування експлантатів, ізольованих у літній період, становила 7 хв. Ефективним для пазушних бруньок *Populus maximowiczii* Henry було витримування у 70 % етиловому спирті (1 хв), з наступним перенесенням у NaClO (2 % активний хлор) (10–18 хв)

(Kärkönen et al., 2011). Інші дослідники (Delgadillo-Díaz et al., 2013) розробили ефективний режим стерилізації експлантатів рослин *Quercus spp.* за використання 70 % етилового спирту та 5,25 % гіпохлориту натрію. Для експлантатів вишні, виокремлених із верхішккових і бічних бруньок однорічних пагонів у березні, застосовували 0,1 % розчин мертіоляту або сулеми (Shakhov et al., 2019) / 12,0 % H_2O_2 / $NaClO$ із 95,2 % активним хлором (Shakhov et al., 2018). Водночас низка авторів зазначають, що режим стерилізації експлантатів залежить від низки чинників, зокрема генотипу донора, фізіологічного стану, віку та типу експлантату, сезону ізоляції (Butenko, 1964; Kärkönen et al., 2011; Payamnour et al., 2014; Podhaietskyi et al., 2016; Shakhov et al., 2018, 2019).

Мета дослідження – оптимізація протоколу стерилізації експлантатів *F. excelsior*, *T. platyphyllos* та *B. pendula* для мікроклонального розмноження. Дослідженнями передбачалося вирішення таких завдань: 1) визначити ефективний режим деконтамінації експлантатів у нестерильних умовах; 2) дібрати стерилізувальні речовини та визначити їх оптимальну концентрацію й експозицію у стерильних умовах; 3) підібрати ефективне живильне середовище на етапі ініціації *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження. Для досліджень використовували 20–30 см частини пагонів, ізольовані із 12-річної *T. platyphyllos*, 10-річної *B. pendula* та 15-річного *F. excelsior* у лютому–березні 2021 р. Для зменшення відсотка контамінації рослинного матеріалу у нестерильних умовах використовували комерційні фунгіцидні препарати: 0,3 % «Фундазол» і 0,1 % «Самшит» ($100 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ крезоксиметил + $200 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ дифеноконазол). Пагони обробляли шляхом обприскування/витри-

мування упродовж доби / не використовували фунгіциди (контроль). Стерилізація рослинного матеріалу (4–8 см фрагменти) полягала у витримуванні (15–20 хв) у мильному розчині (з додаванням кількох крапель детергенту Tween-80) за постійного помішування, промиванні у проточній воді (15–20 хв), споліскуванні у дистильованій воді, зануренні у 70 % етиловий спирт, стерилізації у розчинах та наступному триразовому промиванні у стерильній дистильованій воді (по 5–6 хв у кожній порції). Як стерилізувальні речовини використовували 2,5 % і 5,0 % $NaClO$, 1,0 % та 2,0 % $AgNO_3$. На етапі введення в культуру *in vitro* використовували живильне середовище за прописом MS. До живильних середовищ вносили $100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ мезоінозиту, $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ кінетину, $30 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ сахарози, $2,0 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ активованого вугілля та $7,0\text{--}7,3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ агару мікробіологічного. Показник кислотності середовища (pH) доводили до рівня 5,7–5,9.

Рослинний матеріал культивували за загальноприйнятою методикою у світловому приміщенні за температури $24 \pm 1^\circ\text{C}$ і освітлення $2,0\text{--}3,0 \text{ клк}$ із 16-годинним фотоперіодом та відотною вологістю повітря 70–75 %. Застосовували біотехнологічні методи, зокрема мікроклональне розмноження з використанням культури фрагментів пагонів рослин *in vitro* (Butenko, 1964; Kalinin et al., 1980; Kataeva & Butenko, 1983; Smith, 2012). Повторюваність дослідів чотирикратна. Для опрацювання дослідних даних використовували програмні засоби MS Excel, розраховано середнє та його основну помилку. Для аналізу впливу режиму стерилізації експлантатів на асептичність проведено однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA). У результатах використовували такі скорочення: *F* – розрахунко-

ве значення критерію Фішера; $F_{крит}$ – критичне значення критерію Фішера. Дослідження проведено в науково-дослідній лабораторії біотехнології рослин ВП НУБіП України «Боярська ЛДС» упродовж 2021 р.

Результати дослідження та їх обговорення. Асептичність експлантів – передумова мікроклонального розмноження рослин. Одним із найпоширеніших стерилізувальних агентів для одержання асептичних культур деревних рослин є NaClO (Kärkönen et al., 2011; Delgadillo-Díaz et al., 2013; Payamnour et al., 2014; Shabanova & Mashkina, 2015). Водночас складність одержання значної частки асептичного матеріалу деревних рослин зумовлено морфо-фізіологічними особливостями, тому за аналогією з іншими дослідниками (Skálová et al., 2012; Payamnour et al., 2014; Gaidamashvili et al., 2015) використовували двоступінчасту стерилізацію. Результати до-

сліджень авторів (Butenko, 1964; Payamnour et al., 2014) свідчать про доцільність використання для попередньої стерилізації фунгіцидів. Дію фунгіцидів та стерилізувальних речовин (етилловий спирт, NaClO, AgNO₃) на експлантати наведено у табл. 1.

На 4 добу фіксували ріст біоти (гриби/бактерії) біля основи експлантату на поверхні живильного середовища. Це було спричинено недостатніми асептичними прийомами під час поверхневої стерилізації рослинного матеріалу (Buckley & Reed, 1994). Візуально встановлено, що основу контамінантів становили гриби (понад 80 %, рис. 1, в), бактеріози траплялися зрідка (до 20 %).

Як відомо, для мінімізації токсичної дії стерилізувальних агентів та зменшення частки нежиттєздатних рослин, їх концентрація та експозиція мають бути мінімальними (Kalinin et al., 1980; Kataeva & Butenko, 1983). Відповіді

1. Ефективність стерилізації фрагментів пагонів дослідних рослин в умовах *in vitro*

Варіант	Вид	Фунгіцид (попередня стерилізація)	Режим основної стерилізації	Ефективність стерилізації експлантів (середнє значення ± стандартна похибка), %
1	<i>F. excelsior</i>	–	70 % етиловий спирт (1–2 хв), 5 % NaClO (10 хв) із подальшим перенесенням у 2,0 % AgNO ₃ (9–10 хв)	27,5±3,0
2		обприскування 0,1 % «Самшит»		52,3±4,3
3		замочування у 0,1 % «Самшит» (24 год)		70,3±2,8
4	<i>T. platyphyllos</i>	–	70 % етиловий спирт (1–2 хв), 5 % NaClO (6–7 хв) із подальшим перенесенням у 2,0 % AgNO ₃ (9–10 хв)	29,3±2,2
5		обприскування 0,3 % «Фундазол»		31,3±1,5
6		замочування у 0,3 % «Фундазол» (24 год)		65,0±2,6
7	<i>B. pendula</i>	–	70 % етиловий спирт (1–2 хв), 2,5 % NaClO (5–6 хв) із подальшим перенесенням у 1,0 % AgNO ₃ (5–6 хв)	22,0±3,4
8		обприскування 0,3 % «Фундазол»		57,3±2,2
9		замочування у 0,3 % «Фундазол» (24 год)		58,5±1,9

Рис. 1. Результати стерилізації експлантів: асептичні експлантати рослин *F. excelsior* (а) і *T. platyphyllos* (б); інфіковані міцелієм грибів *B. pendula* (в); життєздатні мікропагони *in vitro* *F. excelsior* (г), *T. platyphyllos* (д), *B. pendula* (е)

експлантів деревних рослин на режимі деконтамінації відрізнялися, що зумовлено морфо-фізіологічними особливостями генотипів. За результатами однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) вплив режиму стерилізації дослідних рослин на асептичність є статистично значущим на рівні 5 % ($F > F_{\text{крит.}}$, $P < 0,05$) (табл. 2).

Результати експериментів показали доцільність витримування рослинного матеріалу у розчинах фунгіцидів та використання ступінчастої стерилізації, що узгоджується із даними інших авторів (Skálová et al., 2012; Payam-

nour et al., 2014; Gaidamashvili et al., 2015). Ефективної стерилізації фрагментів пагонів рослин *B. pendula* досягли шляхом використання ступінчастої стерилізації (70 % етиловий спирт – 12 хв, 2,5 % NaClO й 1,0 % AgNO_3 – 6–7 хв) із попереднім витриманням упродовж доби у 0,3 % розчині «Фундазол» з одержанням $58,5 \pm 1,9$ % асептичності (рис. 1, е). Найвищий відсоток ефективності ($65,0 \pm 2,6$ %) для експлантів рослин *T. platyphyllos* одержали у разі застосування 70 % етилового спирту (1–2 хв), 5,0 % NaClO (6–7 хв) і 2,0 %

2. Підсумкові результати однофакторного дисперсійного аналізу для тканин дослідних рослин *in vitro*

<i>F. excelsior</i>						
Джерело варіації	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i> -значення	<i>F</i> _{крит.}
Між групами	3731	2	1865,3333	39,2014	3,6077	4,2565
<i>T. platyphyllos</i>						
Між групами	3228	2	1614,0833	89,9489	1,1248	4,2565
<i>B. pendula</i>						
Між групами	3435	2	1717,5833	65,5705	4,3106	4,2565

де: *df* – число степенів свободи; *MS* – дисперсії; *F* – розрахункові значення критерію Фішера; *P*-значення – розрахункові значення мінімальної значущості; *F*_{крит.} – критичне значення критерію Фішера

AgNO₃ (9–10 хв) та попереднього витримування у 0,3 % розчині «Фундазол» (рис. 1, б).

Для ефективної нейтралізації екзогенної біоти *F. excelsior* (70,3 ± 2,8 %) доцільно застосовувати режим асептичності, який передбачав використання 70 % етилового спирту (1–2 хв), 2,0 % AgNO₃ і 5,0 % NaClO (9–10 хв) із попереднім витримуванням упродовж доби у 0,1 % розчині «Самшит» (рис. 1, а). На 30–50 добу культивування одержали життєздатні мікропагони із характерною пігментацією без ознак вітрифікації та некротизації на живильному середовищі MS із додаванням 0,25 мг·л⁻¹ кінетину та 2,0 г·л⁻¹ активованого вугілля (рис. 1, з, д, е).

Висновки і перспективи. Оптимізовано протокол стерилізації фрагментів пагонів рослин *F. excelsior*, *T. platyphyllos* та *B. pendula*, ізольованих у лютому–березні, та одержано асептичні життєздатні мікропагони *in vitro*. Показано доцільність витримування рослинного матеріалу у фунгіцидах упродовж доби (0,1 % розчині

«Самшит» – *F. excelsior*; 0,3 % розчині «Фундазол» – *T. platyphyllos*, *B. pendula*) та використання ступінчастої стерилізації із застосуванням етилового спирту, AgNO₃ і NaClO. Установлено, що вплив режиму стерилізації дослідних рослин на асептичність є статистично значущим на рівні 5 %. Для одержання значної кількості асептичних життєздатних мікропагонів (понад 50 %) доцільно використовувати такі протоколи (з попереднім витримуванням у розчині фунгіциду і 70 % етилового спирту упродовж 1–2 хв): 1) 2,5 % NaClO (6–7 хв) і 1,0 % AgNO₃ (6–7 хв) для *B. pendula*; 2) 5,0 % NaClO (6–7 хв) і 2,0 % AgNO₃ (9–10 хв) – для *T. platyphyllos*; 3) 2,0 % AgNO₃ і 5,0 % NaClO (9–10 хв) – для *F. excelsior*. Для ініціації експлантів застосовувати живильне середовище за прописом MS із додаванням 0,25 мг·л⁻¹ кінетину і 2,0 г·л⁻¹ активованого вугілля. Подальші дослідження спрямовані на розроблення протоколу прямої регенерації мікропагонів за дії компонентів живильного середовища *in vitro*.

Список літератури

- Buckley, P. M., & Reed, B. M. (1994). Antibiotic susceptibility of plant associated bacteria. *HortScience*, 29(5), 434.
- Butenko, R. G. (1964). *Culture of Isolated Tissues and Physiology of Plant Morphogenesis*. Moscow: Nauka [in Russian].
- Delgadillo-Díaz de, León José Silvestre, Morales-Domínguez, José Francisco, del Socorro Santos-Díaz, María, & Pérez-Molphe-Balch, Eugenio. (2013). *In vitro* Propagation of Mexican Oaks (*Quercus* spp.). *Polibotánica*, 35, 85–97.
- Gaidamashvili, M., Khurtsidze, E., & Barblishvili, T. (2015). Micropropagation of Threatened *Betula* Species for *in vitro* Conservation. *International Conference on Plant, Marine and Environmental Sciences (PMES-2015)*. Kuala Lumpur (Malaysia), Jan. 1–2, 12–15. Available at <http://iicbe.org/upload/7805C0115056.pdf>.
- Kakimzhanova, A. A., Zhagipar, F. S., Naziran, F., Karimova, V. K., & Nurtaza, A. S. (2019). Optimization of Microclonal Propagation Conditions for Increasing the Multiplication Factor of Poplar Microshoots. *Bulletin of L.N. Gumilyov Eurasian National University. Bioscience Series*, 1 (126), 57–65 [in Russian]. <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2019-126-1-57-65>
- Kalinin, F. L., Sarnatskaya, V. V., & Polishchuk, V. E. (1980). *Methods of Tissue Culture in Plant Physiology and Biochemistry*. Kyiv: Naukova dumka [in Ukrainian].
- Kärkönen, A., Santanen, A., Iwamoto, K., & Fukuda, H. (2011). Plant Tissue Cultures. *The Plant Cell Wall: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, 715, 1–20. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-008-9_1
- Kataeva, N. V., & Butenko, R. H. (1983). *Clonal Micropropagation of Plants*. Moscow: Nauka [in Russian].
- Lebedev, V., & Shestibratov, K. (2016). Large-Scale Micropropagation of Common Ash.

- Biotechnology*, 15 (1–2), 1–9. <https://doi.org/10.3923/biotech.2016.1.9>
- Lutova, L. A. (2003). *Biotechnology of higher plants*. SPb.: Publ. house of S-Peterb. UN [in Russian].
- Murashige, T. A., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*, 15 (3), 473–497.
- Payamnour, V., Ghasemi Bezdi, K., Mehrdad, M., & Ahmadi, A. (2014). Optimization of *in vitro* sterilization protocol for obtaining contamination-free cultures of *Tilia platyphyllos*. *Nusantara Bioscience*, 6 (1), 7–12. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n060102>
- Podhaietskyi, A. A., Mackiewicz, V. V., & Wroblewski, S. A. (2016). Use of PPM biocide as an additional decontaminant in the process of microclonal reproduction of vegetable substances. *Bulletin of Sumy National Agrarian University. The series: Agronomy and Biology*, 9 (32), 156160 [in Ukrainian].
- Shabanova, E. A., & Mashkina, O. S. (2015). Clonal micropropagation of economically valuable forms of poplar. *Forest selection and genetics*, 4, 74–81 [in Russian].
- Shakhov, V. V., Fedotova, I. E., Tashmatova, L. V., Matsneva, O. V., & Khromova, T. M. (2019). Comparative analysis of sterilizers on the basis of periodization of their use. *Vestnik KrasGAU*, 12, 38–42 [in Russian]. <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2019-12-38-42>
- Shakhov, V. V., Tashmatova, L. V., Matsneva, O. V., & Khromova, T. M. (2018). The effectiveness of sterilizing agents in the introduction of cherry varieties to *in vitro* culture. *Contemporary horticulture*, 4, 32–37 [in Russian]. <https://doi.org/10.24411/2312-6701-2018-10405>
- Skálová, D., Navrátilová, B., Richterová, L., Knittl, M., Sochor, M., & Vašut, R. J. (2012). Biotechnological Methods of *in vitro* Propagation in Willows (*Salix* spp.). *Central European Journal of Biology*, 7 (5), 931–940. <https://doi.org/10.31255/978-5-94797-319-8-1244-1247>
- Smith, R. H. (2012). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. Burlington: Elsevier Science.

Chornobrov O. Yu., Tkachova O. E. OPTIMIZATION OF EXPLANTS *IN VITRO* STERILIZATION PROTOCOL OF SOME DECIDUOUS TREE SPECIES

One of the methods of obtaining planting material of deciduous plants, in particular common ash (*Fraxinus excelsior* L.), broad-leaved linden (*Tilia platyphyllos* Scop.) and silver birch (*Betula pendula* Roth) is microclonal propagation. Asepticity of explants is a prerequisite for microclonal plant propagation. Chemical sterilization with liquid substances is mostly used for this purpose. The mode of decontamination is influenced by a number of factors, in particular the genotype of the plant. The purpose of the study was to optimize the sterilization protocol of *F. excelsior*, *T. platyphyllos* and *B. pendula* explants for microclonal propagation. For research, 20–30 cm of shoots isolated from 12-year-old *T. platyphyllos*, 10-year-old *B. pendula*, and 15-year-old *F. excelsior* in February–March 2021 were used. Plant material was cultured according to conventional methods on a nutrient medium MS (Murashige & Skoog, 1962). Biotechnological methods were used (plant tissue culture *in vitro*, microclonal propagation). MS Excel software package was used to process the experimental data, the mean and its standard error were calculated. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to analyze the effect of explant sterilization on asepsis. The expediency of keeping plant material during the day in 0.1 % solution of “Samshit” – *F. excelsior* and 0.3 % solution “Fundazole” – *T. platyphyllos* and *B. pendula* is shown. The sterilization protocol of experimental plants (efficiency over 50 %) was optimized by using a stepwise method using 70 % ethyl alcohol, 1.0 % and 2.0 % AgNO_3 and 2.5 % and 5.0 % NaClO . The effect of the sterilization regime of experimental plants on asepsis is statistically significant at the level of 5%. To initiate the explants, a culture medium according to the MS prescription was used with the addition of 0.25 mg/L kinetin and 2.0 g/L activated carbon. Further studies are aimed at developing a protocol for direct regeneration of microshoots of *F. excelsior*, *T. platyphyllos* and *B. pendula* under the action of components of the culture medium *in vitro*.

Keywords: *in vitro* plant tissue culture, *Fraxinus excelsior* L., *Tilia platyphyllos* Scop., *Betula pendula* Roth, sterilization, explants, regenerative ability, culture medium, microclonal propagation.

Отримано: 2021-06-11