

- potato tubers treated with biopreparations]. *Protsessy i apparaty pishchevykh proizvodstv*, no.1, pp. 19–25 (in Russian).
9. Troshina N.V., Yarullina L.G., Surina O.B., Maksimov I.V. (2006). Induktory ustoychivosti rasteniy i aktivnyye formy kisloroda [Inducers of plant resistance and reactive oxygen species]. *Tsitologiya* [Cytology], Iss. 4. pp 338–342 (in Russian).
 10. Chalova L.I., Nogaydeli D.E., Karavaeva K.A., Ozeretskoykaya O.L. (1985). Aktivnost peroksidazy i polifenoloksidazy marker sensibilizatsii klubney kartofelya [The activity of polyphenol oxidase and peroxidase marker of potatoes tubers sensitization]. *Mikologiya i fitopatologiya*. [Mycology and fytopatology], vol. 19, no. 6. pp. 495–498 (in Russian).
 11. Benizri E. (2001). Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol science and technology*, no. 11, pp. 557–574 (in English).
 12. Osnovnye metody fitopatologicheskikh issledovaniy Ed. Chumakov A.Ye. [Main methods of phytopathological research]. Moscow, 1974, 192 p. (in Russian).
 13. Metody biokhimitskogo issledovaniya rasteniy. Ed. Yermakova A.I. [Methods of biochemical research of plants]. Leningrad: Kolos, 1972, 455 p. (in Russian).
 14. Pausheva Z.P. (1988). Praktikum po tsitologii rasteniy [Workshop on plant cytology]. Moscow: Agropromizdat, vol. 4, 271 p. (in Russian).

УДК 581.1:635.9

ДЕКОНТАМІНАЦІЯ ТА ПЕРВИННЕ КУЛЬТИВУВАННЯ ЕКСПЛАНТІВ *AGAPANTHUS SP.*

А.П. Стадник, В.В. Мацкевич, Л.М. Філіпова, Т.В. Пасічник

Білоцерківський національний аграрний університет

Випробувано різні схеми застосування стерилізаційних агентів системної дії (антибіотики, фунгіциди) у комплексі з гіпохлоритом натрію та різні види експлантів. Встановлено вплив походження первинних експлантів на утворення рослин-регенерантів. Виявлено високу ефективність застосування як додаткової деконтамінації препаратів Превікур Енерджі 840 SL та Максим Форте 050 FS за усіма досліджуваними показниками: часткою виживання експлантів, показником деконтамінації, виходом регенерантів з експлантів. Обґрунтовано доцільність використання рослин-донорів експлантів віком 90 днів для клонального мікророзмноження агпантусу сортів Шарлота, Чорна магія.

Ключові слова: клональне мікророзмноження, рослина-донор, експлант, контамінація, агпантус, *in vitro*.

Агпантус (*Agapanthus sp.*) – цінна, декоративна рослина, для пришвидшення розмноження якої з комерційною метою використовують культуру тканин [1]. Однак стримуючим чинником для введення в асептичну культуру є глибока контамінація експлантів грибною та бактеріальною мікрофлорою [2, 3]. Основною умовою успішного асептичного культивування є стерилізація внутрішніх тканин без їх пошкодження. Це обумовлено контамінацією поверхневих покривів органів рослин різ-

номанітними грибовими і бактеріальними інфекціями. До того ж за вирощування на штучному живильному середовищі у процесі життєдіяльності вони поглинають з нього поживні речовини, виділяючи токсини, які гальмують біологічні процеси у клітинах рослин, накопичуючись у середовищі, і за тривалого впливу спричиняють їх загибель.

Ефективність процесу (Е1) визначають за відношенням кількості неінфікованих експлантів після стерилізації (с) до вихідної кількості експлантів, що стерилізувалися (s), у відсотках [4]:

$$E_1 = \frac{c}{s} \times 100\%.$$

Вплив стерилізаційної речовини залежить від її виду, концентрації, підготовки експлантів та експозиції. Успішне проходження процесу залежить також від щільності та чутливості тканин, що контактують із антисептиком. Вдалий вибір стерилізаційного агента полягає у тому, щоб препарат був наділений високою активністю стосовно всіх мікроорганізмів і, водночас, найменше пошкоджував тканини рослини. Застосування гіпохлориту натрію та перманганату калію для поверхневої стерилізації є малоєфективним, тому нами випробувано різні схеми застосування стерилізаційних агентів системної дії (антибіотики, фунгіциди) у комплексі з гіпохлоритом, а також використання різних видів експлантів.

Мета досліджень – визначити оптимальні схеми стерилізації первинних експлантів, регенерації з них рослин *in vitro* та їх прискорене розмноження.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експланти агантантусу нових сортів Шарлотта (*Charlotte*) – *Agapanthus umbellatus*

та Чорна магія (*Black magic*) – *Agapanthus praecox* культивували *in vitro* на штучному живильному середовищі Мурасіге і Скуга з додаванням 30 г/л сахарози. Обсяг вибірки становив 50 рослин за трикратної повторності. Кожна рослина була як окреме біологічне повторення [5]. Ефективність стерилізації визначали за М.Е. Ламберовою [4].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено вплив походження рослин-донорів на звільнення експлантів від чинників контамінації (табл. 1). Із рослин сорту Шарлотта, які у нативних умовах (*in situ*) тривалий час росли, квітували та розмножувалися вегетативно, отримано експланти з вищим показником деконтамінації порівняно з рослинами, що виростили з насіння і вперше утворили бутони. Це дає змогу припустити, що тривале вегетативне розмноження у природних умовах підвищує контамінацію мікроорганізмами садового матеріалу.

На ефективність деконтамінації експлантів *Agapanthus umbellatus* сорту Шарлотта впливало також місце їх ізоляції з донорської рослини *in vivo* (рис. 1, табл. 2). Найнижча ефективність спостерігалася за

Таблиця 1

Вплив походження рослин-донорів *Agapanthus umbellatus* на деконтамінацію експлантів* (сорт Шарлотта)

| Рослини-донори | Живі експланти, % | Інфіковані, % | | Ефективність деконтамінації, % |
|--|-------------------|---------------|--------------|--------------------------------|
| | | на 10-й день | на 30-й день | |
| Після двох і більше поділів <i>in situ</i> | 72±4 | 10±2 | 21±3 | 41 |
| Без поділу, перше цвітіння | 77±5 | 2±1 | 3±1 | 72 |

Примітка: * експланти, ізольовані із недорозвинених бутонів.

Таблиця 2

Вплив типу експлантів *Agapanthus umbellatus* на їх деконтамінацію (сорт Шарлотта)

| Місце ізоляції експланта | Живі експланти, % | Інфіковані, % | | Ефективність деконтамінації, % | Період регенерації, днів |
|--------------------------|-------------------|---------------|--------------|--------------------------------|--------------------------|
| | | на 10-й день | на 30-й день | | |
| Пазушна брунька | 36 | 32 | 35 | 1 | 57 |
| Квітка | 47 | 19 | 33 | 5 | 93 |
| Основа суцвіття | 53 | 17 | 21 | 15 | 72 |

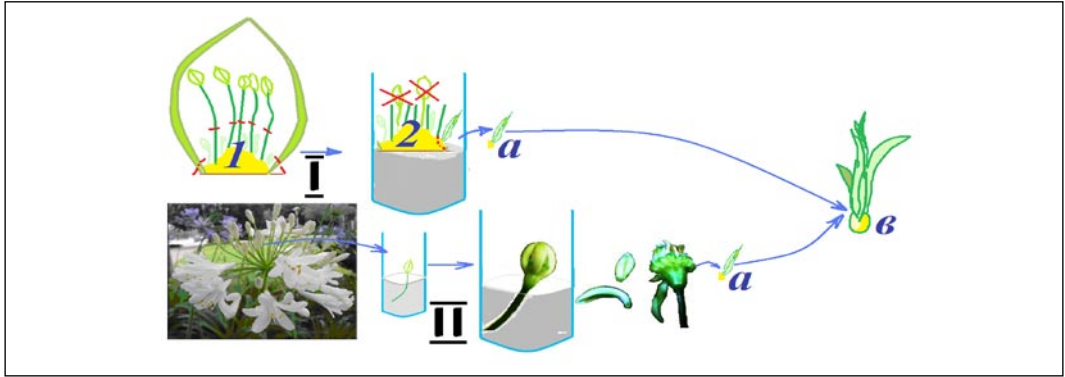


Рис. 1. Схема отримання регенерантів *Agapanthus umbellatus* з експлантів, ізольованих із основи суцвіття (I) та з квітки (II): 1 – експлант перед введенням *in vitro*; 2 – асептичне культивування; а – утворення адвентивної бруньки; в – утворення мікророслин

використання пазушних бруньок, ізольованих з підземних кореневищ, – контамінація більшості експлантів проявлялася вже на 10-й день культивування, а на 30-й день вільними від контамінації залишився лише один експлант із 100 ізольованих.

Порівняно вищою була ефективність деконтамінації рослин за використання експлантів, ізольованих із квіток, однак вихід адвентивних бруньок був меншим та потребував більше часу.

Застосування основ суцвіть як експлантів під час уведення в культуру *in vitro* агпантусу сорту Шарлотта дало можливість отримати 53% живих експлантів, а ефективність деконтамінації становила 15%. Пізніше цей метод удосконалено нами за результатами випробування ефективності додаткової деконтамінації, що застосовувалася на фоні суміші гіпохлориту натрію та перманганату калію (табл. 3).

Незважаючи на раніше встановлену [6] ефективність застосування антибіотиків для деконтамінації експлантів хости, їхня дія не проявилася щодо *Agapanthus* [7]. Окрім того, застосування левоміцетину порівняно з контролем (без додаткових деконтамінантів лише суміш гіпохлориту натрію та перманганату калію) вповільнювало утворення та зменшувало кількість адвентивних бруньок – із 3,2 до 1,1% стосовно сорту Шарлотта та із 7,1 до 3,8% щодо сорту Чорна магія.

Таку особливість могла спричинити контамінація експлантів не лише бактеріальною, а й грибною інфекціями. Наприклад, було встановлено грибну інфекцію в ендоспермі *Castanea sativa* Mill. [8].

Ефективність застосування як додаткової деконтамінації фунгіциду Фундазол (беноміл) статистично не відрізнялася від контролю. Варіант із застосуванням Превікур Енерджи 840 SL був ефективнішим як порівняно з контролем, так і з рештою досліджуваних варіантів за усіма показниками. Зокрема, виживання експлантів у сорті Шарлотта порівняно з контролем зросло із 52,1 до 71,5%, показник деконтамінації зріс із 14,2 до 40,8%. Зменшився період, необхідний для утворення в експлантів адвентивних вегетативних бруньок, які відокремлювалися і у наступних субкультивуваннях утворювали мікророслини. Також зафіксовано збільшення виходу регенерантів з експлантів із 3,2 (на контролі) до 24,3%. Максим Форте 050 FS був ефективнішим від контролю за усіма показниками, але поступався Превікур Енерджи 840 SL.

Отже, зростання частки живих експлантів після стерилізації та скорочення тривалості необхідного періоду для утворення адвентивних бруньок і збільшення виходу регенерантів свідчить не лише про вплив деконтамінації (фунгіцидна дія), але й про стимулюючий ефект від застосування цього препарату на регенераційний процес.

Таблиця 3

Вплив комплексного застосування антибіотиків і фунгіцидів із гіпохлоритом натрію на деконтамінацію експлантів (основа суцвіття) *Agapanthus umbellatus*

| Тип експланта | Живі експланти, % | | Ефективність деконтамінації, % | | Початок утворення адвентивних бруньок, днів | | Кількість утворених регенерантів, % | |
|---|-------------------|-------------|--------------------------------|-------------|---|-------------|-------------------------------------|-------------|
| | Шарлотта | Чорна магія | Шарлотта | Чорна магія | Шарлотта | Чорна магія | Шарлотта | Чорна магія |
| Контроль (гіпохлорит натрію та перманганат калію) | 52,1 | 56,7 | 14,2 | 17,6 | 64,6 | 51,8 | 3,2 | 7,1 |
| Левоміцитин (Дарниця) (<i>Chloramphenicol</i>) | 53,8 | 51,2 | 14,9 | 12,3 | 72,1 | 69,6 | 1,1 | 3,8 |
| Гентаміцину сульфат (Дарниця) | 50,6 | 60,4 | 10,9 | 14,4 | 61,2 | 58,4 | 1,7 | 3,3 |
| Беноміл (фундазол) | 62,1 | 67,3 | 15,3 | 19,6 | 71,0 | 67,6 | 1,9 | 5,5 |
| Превікур Енерджи 840 SL, в.р.к. – (Bayer Garden) | 71,5 | 73,9 | 40,2 | 47,6 | 27,4 | 21,4 | 24,3 | 28,8 |
| Максим Форте 050 FS т.к.с. – (Syngenta) | 70,1 | 68,6 | 38,3 | 41,6 | 61,8 | 59,7 | 9,3 | 7,2 |
| НІР ₀₅ | 3,3 | 4,0 | 1,6 | 2,8 | – | – | 2,6 | 0,9 |

Походження первинних експлантів впливало на утворення рослин-регенерантів (рис. 2).

Із основи суцвіття формувалася одна велика рослина, тоді як з квітки впродовж довшого періоду формувалася більша кількість регенерантів менших розмірів. Сам експлант розростається у конгломерат, який від розростання його частин розпадався на шматки. Одні з них мали типові для цього виду листки, а інші – квіткові пелюстки-оцвітчини зеленого кольору.

За культивування експлантів, ізольованих із квітки, регенеранти збільшувалися у розмірах та набували зеленого забарвлення. У місцях прикріплення закладалися бруньки як квіткові, так і вегетативні, розросталося квітколоже. Однак утворення пагонів з таких бруньок відбувалося повільніше порівняно із бруньками, що утворилися в основі суцвіття. Частина експлантів набувала ознак вітрифікації (гіпергідратації). Проте із основи суцвіття утворювався один, рідше – два регенеранти, тоді як на експлантах квіткового походження їх утворювалося 5–9 (рис. 3), іноді до 20 шт.

У першому випадку рослини були більших розмірів та утворювали дочірні рослини, в другому – регенеровані рослини були менших розмірів і щільно розміщувалися одна біля одної на експланті.

За субкультивування *in vitro* встановлено вплив віку рослин донорів експлантів

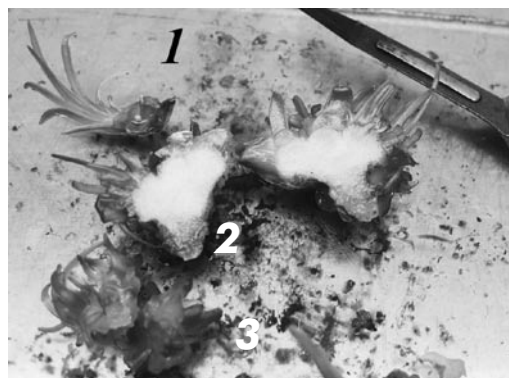


Рис. 2. Утворення первинних регенерантів *Agapanthus umbellatus* із експлантів на 45-й день культивування: 1 – регенеранти із основи суцвіття; 2 – регенеранти із квітки; 3 – вітрифіковані регенеранти із квітки



Рис. 3. Утворення первинних регенерантів *Agapanthus umbellatus* із експлантів на 90-й день культивування: 1 – регенеранти із основи суцвіття; 2 – регенеранти із квітки; а – утворення дочірніх рослин

на ефективність регенерації із них рослин-регенерантів (рис. 4, табл. 4). Використання донорів експлантів віком 30 і 45 днів зумовлювало низьку приживлюваність (27–58%). За висотою пагона регенеранти цих варіантів істотно відрізнялися від рослин, ізолюваних із 90-денних донорів. Так, висота регенерантів сорту Шарлотта із донорів віком 90 днів становила 82 мм при 16 і 18 мм у регенерантів із донорів віком 30 і 45 днів відповідно. Отже, для клонального мікророзмноження агапантусу сортів Шарлотта, Чорна магія доцільним є використання рослин-донорів експлантів віком 90 днів.



Рис. 4. Вплив віку вихідних рослин на приживання ізолюваних мікропагонів через: 1 – 30 днів; 2 – 45 днів; 3 – 90 днів

Таблиця 4

Вплив віку донорів експлантів на приживання та морфогенез регенерації рослин

| Вік рослин-донорів, днів | Прижилось експлантів, % | Висота пагона, мм | Кількість пагонів у куці, шт. |
|--------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------------|
| <i>Сорт Шарлотта</i> | | | |
| 30 | 27 | 16 | 1,1 |
| 45 | 45 | 18 | 1,3 |
| 90 | 98 | 82 | 3,2 |
| <i>Сорт Чорна магія</i> | | | |
| 30 | 31 | 27 | 1,2 |
| 45 | 58 | 63 | 1,3 |
| 90 | 100 | 107 | 3,6 |

ВИСНОВКИ

Тривале вирощування рослин до норів *in situ* збільшує частку контамінації ізольованих із них експлантів. Встановлено високу ефективність від ізоляції експлантів представників роду *Agapanthus* із основи суцвіття внаслідок

їх найменшої контамінації. Для перших субкультивувань доцільно застосовувати вихідні рослини віком 90 днів. Встановлено високу ефективність деконтамінації експлантів способом замочування їх у розчині системного фунгіциду Превікур Енерджи 840 SL.

ЛІТЕРАТУРА

1. 4 klover aims to delight everyone // Gartner tidende. – 2012. – No. 2. – P. 44.
2. Baskaran P. Rapid *in vitro* micropropagation of *Agapanthus praecox* / P. Baskaran, J.V. Staden // Rapid South African Journal of Botany. – 2013. – Vol. 86. – P. 46–50.
3. Somaclonal Variation and Stability of GUS Gene Expression in Transgenic *Agapanthus (Agapanthus praecox* ssp. *orientalis)* Plants at the Flowering Stage / Shiro Mori, Eriko Oka, Hiroto Umehara et al. // *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant.* – 2007. – Vol. 43. – No. 1. – P. 79–87.
4. Пат. 2324338 Российская Федерация. Способ получения биомассы *in vitro* / М.Э. Ламберова, В.Н. Хмелев, А.А. Ламберова и др.; заявитель и патентообладатель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова». – Заявл. 25.01.2007; опубл. 20.05.2008, Бюл. № 14 (7 с.).
5. Широконос А.М. Оптимальні вибірки рослин у дослідженнях картоплі в культурі *in vitro* / А.М. Широконос, В.В. Мацкевич // Фізіологія і біохімія культурних рослин. – 2002. – Вип. 34, № 4. – С. 353–359.
6. Мацкевич В.В. Особливості стерилізації експлантів хости / В.В. Мацкевич, Л.М. Філіпова, Р.Д. Діба // Науковий вісник НЛТУ України. – 2013. – Вип. 23.5 – С. 183–187.
7. Мацкевич В.В. Особливості введення *in vitro Agapanthus umbellatus* / В.В.Мацкевич, Р.Д. Діба, Л.М. Філіпова // Тези доповідей державної науково-практичної конференції «Новітні технології в рослинництві». – Біла Церква, 2013. – С. 4.
8. Небиков М.В. Удосконалення методики стерилізації експлантів унаслідок введення у культуру *in vitro Castanta sativa* Mill. / М.В. Небиков, В.Д. Адаменко // Науковий вісник НЛТУ України. – 2011. – Вип. 21.10. – С. 30–34.

REFERENCES

1. 4 klover aims to delight everyone. Gartner tidende, 2012, no. 2, P. 44 (*in English*).
2. Baskaran P., Staden J.V. Rapid *in vitro* micropropagation of *Agapanthus praecox*. Rapid South African Journal of Botany. Vol. 86, May 2013, pp. 46–50 (*in English*).
3. Shiro Mori, Eriko Oka, Hiroto Umehara, Sakae Suzuki, Hitoshi Kobayashi, Yosuke Hoshi, Masayoshi Kondo, Yosuke Koike, Masaru Nakano. Somaclonal Variation and Stability of GUS Gene Expression in Transgenic *Agapanthus (Agapanthus praecox* ssp. *orientalis)*. Plants at the Flowering Stage, *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, Vol. 43, no. 1, 2007, pp. 79–87 (*in English*).
4. Lamberova M.E., Khmelev V.N., Lamberova A.A. etc. Sposob polucheniya biomasy *in vitro* [A process for preparing a biomass *in vitro*]. Patent RF, no. 2324338, 2007 (*in Russian*).
5. Shyrokonos A.M., Mackiewicz V.V. (2002). Optymaljni vybirky roslin u doslidzhennjakh kartopli v kul'turi in vitro [Optimal sample of plants in the potato studies in vitro culture]. Fiziologhiia i biokhimiia kulturnykh roslin [Physiology and Biochemistry crops], Iss. 34, no. 4, pp. 353–359 (*in Ukrainian*).
6. Mackiewicz V.V., Filippova L.M., Dyba R.D. (2013). Osoblyvosti sterylizacii eksplantiv khosty [Features of hosts explants sterilization]. Naukovyi visnyk NLTU: zbirnyk naukovo-tekhnichnykh prats. [Scientific Bulletin of NLTU: collection of scientific works], Lviv: RVV NLTU Ukraine, Iss. 23.5, pp. 183–187 (*in Ukrainian*).
7. Matskevych V.V., Dyba R.D., Filipova L.M. (2013). Osoblyvosti vvedennia *in vitro Agapanthus umbellatus* [Features of introduction in vitro *Agapanthus umbellatus*]. Tezy dopovidei derzhavnoi naukovo -praktichnoi konferentsii «Novitni tekhnologii v roslinnytstvi» [Proc. state scientific and practical conference «New technologies in plant growing»], Bila Tserkva, p. 4 (*in Ukrainian*).
8. Nebykov M.V., Adamenko V.D. (2011). Udoshkonalennia metodyky sterylizatsii eksplantiv unaslidok vvedennia u kulturu *in vitro Castanta sativa* Mill [Improved methods of sterilization of explants due to the introduction to the culture *in vitro Castanta sativa* Mill]. Naukovyi visnyk NLTU Ukrainy [Scientific Herald of NLTU], Iss. 21.10, pp. 30–34 (*in Ukrainian*).