

# 1. ЛІСОВЕ ТА САДОВО-ПАРКОВЕ ГОСПОДАРСТВО

УДК 630\* 165 Проф. М.М. Гузь, д-р с.-г. наук; доц. Р.М. Гречаник, канд. с.-г. наук; аспір. М.М. Лісовий – НЛТУ України, м. Львів

## СТЕРИЛІЗАЦІЯ ВИХІДНИХ ЕКСПЛАНТАНТІВ МОРФОЛОГІЧНИХ ФОРМ БУКА ЛІСОВОГО ПІД ЧАС РОЗМНОЖЕННЯ IN VITRO

Наведено результати експериментів щодо підбору оптимального способу стерилізації вихідних експлантантів морфологічних форм бука лісового для розмноження in vitro. Встановлено, внаслідок застосування запропонованих способів стерилізації частина експлантантів були асептичними. У разі використання реагентів високої концентрації у низці експлантантів спостерігалось почорніння (загибель). За низьких концентрацій чи вилученні одного з реагентів спостерігалось зараження експлантантів через 8-12 днів після садіння.

**Ключові слова:** бук лісовий, морфологічна форма, експлантант, стерилізація, реагент.

*Prof. M.M. Guz; assoc. prof. R.M. Grechanyk; post-graduate M.M. Lisoviy –  
NUFWT of Ukraine, L'viv*

## Sterilization of initial explantants of morphological forms of beech european at reproduction in vitro

The results of experiments on selection of optimum method of sterilization of initial explants of morphological forms of beech European at reproduction in vitro are presented. It is set, as a result of application of the offered methods of sterilization part of explantant were aseptic. In the case of the use of reagents of high concentration there was почорніння in the row of explantant (death). At low concentrations or exception of one of reagents there was an infection of explantant in 8-12 days after seating.

**Keywords:** beech European, morphological form, explantant, sterilization, reagent.

Бук лісовий – цінна лісоутворювальна порода України, яку широко використовують у різних галузях економіки [6, 7, 9]. Цінні морфологічні форми бука не розмножуються насінним способом, за винятком пурпуристої форми. Тому потрібно звернути увагу на принципово нові способи відтворення бука лісового, до яких належить метод культури тканин [4, 5].

Для розмноження морфологічних форм бука лісового як експлантанти використовували апекси верхівкових та бічних бруньок, які заготовляли у другій половині лютого. Одним із найскладніших завдань у розмноженні рослин in vitro є отримання стерильної культури. Завданням стерилізації є знищити епіфітну мікрофлору та не пошкодити при цьому тканини рослин. Щоб визначити найкращий спосіб стерилізації для експлантантів морфологічних форм бука лісового, застосовували різні комбінації реагентів та їхніх концентрацій [1-3, 8, 10, 11] (табл. 1). Як реагенти-стерилізатори використовували п'ять речовин: етанол (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) у концентрації 50-96 %, протічну воду з детергентом (мило господарське) тривалістю 2-24 год., гіпохлорид натрію

(NaClO) у концентрації 30-70 %, двоокис водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) у концентрації 1-3 %, нітрат срібла (AgNO<sub>3</sub>) у концентрації 0,1-0,3 %.

Процес стерилізації виконували почерговим занурюванням експлантантів у відповідні реагенти-стерилізатори з певною експозицією. Після оброблення кожним реактивом експлантанти промивали три рази дистильованою стерильною водою протягом 5-8 хв. Для подолання внутрішньої інфекції експлантантів використовували антибіотик "Цефазолін-КМП". У 10 %-й розчин антибіотика занурювали попередньо простерилізовані експлантанти на 10-15 сек. безпосередньо перед садінням.

**Табл. 1. Способи стерилізації вихідних експлантатів бука лісового**

| Варіант досліджу | Застосований реагент (у порядку використання) |           |                                 |          |          |                                  |           |                               |           |                   |          |
|------------------|-----------------------------------------------|-----------|---------------------------------|----------|----------|----------------------------------|-----------|-------------------------------|-----------|-------------------|----------|
|                  | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH              |           | H <sub>2</sub> O з де-тергентом | NaClO    |          | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH |           | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |           | AgNO <sub>3</sub> |          |
|                  | Конц., %                                      | Час, сек. | Час, год.                       | Конц., % | Час, хв. | Конц., %                         | Час, сек. | Конц., %                      | Час, сек. | Конц., %          | Час, хв. |
| 1                | -                                             | -         | 2                               | 30       | 5        | 50                               | 10        | 1                             | 5         | 0,1               | 5        |
| 2                | -                                             | -         | 8                               | 50       | 5        | 70                               | 10        | 2                             | 5         | 0,2               | 5        |
| 3                | -                                             | -         | 24                              | 70       | 5        | 96                               | 10        | 3                             | 5         | 0,3               | 5        |
| 4                | 96                                            | 10        | 2                               | 30       | 10       | -                                | -         | 1                             | 10        | 0,1               | 10       |
| 5                | 96                                            | 10        | 8                               | 50       | 10       | -                                | -         | 2                             | 10        | 0,2               | 10       |
| 6                | 96                                            | 10        | 24                              | 70       | 10       | -                                | -         | 3                             | 10        | 0,3               | 10       |
| 7                | 96                                            | 5         | 24                              | 30       | 15       | 70                               | 5         | -                             | -         | 0,1               | 15       |
| 8                | 96                                            | 10        | 24                              | 30       | 20       | 70                               | 10        | -                             | -         | 0,2               | 15       |
| 9                | 96                                            | 15        | 24                              | 30       | 25       | 70                               | 15        | -                             | -         | 0,3               | 15       |
| 10               | 96                                            | 10        | -                               | 30       | 10       | 70                               | 10        | 3                             | 15        | 0,1               | 5        |
| 11               | 96                                            | 10        | -                               | 30       | 20       | 70                               | 20        | 3                             | 20        | 0,2               | 5        |
| 12               | 96                                            | 10        | -                               | 30       | 30       | 70                               | 30        | 3                             | 30        | 0,3               | 5        |
| 13               | 96                                            | 10        | 24                              | 30       | 10       | 70                               | 5         | 2                             | 10        | 0,2               | 5        |
| 14               | 96                                            | 15        | 24                              | 30       | 15       | 70                               | 10        | 2                             | 15        | 0,2               | 10       |
| 15               | 96                                            | 20        | 24                              | 30       | 20       | 70                               | 15        | 2                             | 20        | 0,2               | 15       |

Внаслідок застосування наведених вище способів стерилізації отримано результати, які дуже різняться між собою (табл. 2). Частина експлантантів були асептичними. У разі використання реагентів високої концентрації у низці експлантантів спостерігалось почорніння (загибель). І навпаки, за низьких концентрацій чи вилученні одного з реагентів спостерігалось зараження експлантантів через 8-12 днів після садіння.

Дані табл. 2 свідчать, що високу частку заражених експлантантів отримано від стерилізації у варіантах досліду № 1 (96 %) та № 2 (86 %). Швидше за все, це спричинено вилученням першочергового обробітку експлантантів розчином етанолу, який слугує для зняття воскового нальоту з рослинного матеріалу. Також за цих способів стерилізації досить коротка експозиція експлантантів у інших реагентах-стерилізаторах. Аналогічна ситуація спостерігається у разі вилучення із стерилізації етанолу для обробітку розібраних експлантантів (варіант досліду № 4-100 % зараженість та варіант досліду № 5-86 % зараженість). Без промивання експлантантів водою з господарським милом варіанти досліду № 10, 11 і 12 теж дали високу частку зараженості – 94, 84 та 60 % відповідно (рис. 1).

**Табл. 2. Ефективність стерилізації експлантантів бука лісового**

| Варіант досліджу | Вихідна к-сть експлантатів, шт. | Кількість експлантантів через 12 днів |     |      |    |           |    |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-----|------|----|-----------|----|
|                  |                                 | заражені                              |     | живі |    | почорнілі |    |
|                  |                                 | шт.                                   | %   | шт.  | %  | шт.       | %  |
| 1                | 50                              | 48                                    | 96  | 2    | 4  | -         | -  |
| 2                | 50                              | 43                                    | 86  | 3    | 6  | 4         | 8  |
| 3                | 50                              | 11                                    | 22  | 1    | 2  | 38        | 77 |
| 4                | 50                              | 50                                    | 100 | -    | -  | -         | -  |
| 5                | 50                              | 43                                    | 86  | 7    | 14 | -         | -  |
| 6                | 50                              | 22                                    | 44  | 3    | 6  | 25        | 50 |
| 7                | 50                              | 26                                    | 52  | 12   | 24 | 12        | 24 |
| 8                | 50                              | 17                                    | 34  | 15   | 30 | 18        | 36 |
| 9                | 50                              | 7                                     | 14  | 11   | 22 | 32        | 64 |
| 10               | 50                              | 47                                    | 94  | 3    | 6  | -         | -  |
| 11               | 50                              | 42                                    | 84  | 7    | 14 | 1         | 2  |
| 12               | 50                              | 30                                    | 60  | 12   | 24 | 8         | 16 |
| 13               | 50                              | 7                                     | 14  | 43   | 86 | -         | -  |
| 14               | 50                              | 1                                     | 2   | 49   | 98 | -         | -  |
| 15               | 50                              | 3                                     | 6   | 42   | 84 | 5         | 10 |

Під час стерилізації способом № 3 простежено найбільшу кількість експлантантів (77 %), які були "спалені" реагентами високої концентрації. Для варіанта досліджу № 9 експлантанти могли загинути від тривалості експозиції у відповідних реактивах. Найбільший вихід асептичних експлантантів було отримано внаслідок їхньої стерилізації у варіантах досліджу № 13, 14, 15-86, 98 та 84 % відповідно (рис. 2).



**Рис. 1. Інфікований експлантант**



**Рис. 2. Стерильний експлантант**

Тому під час розмноження морфологічних форм бука лісового *in vitro* для стерилізації експлантантів ми рекомендуємо використовували варіант досліджу № 14, який полягав у виконанні таких послідовних операцій: занурення бруньок на 15 сек. у 96 %-й етанол (видалення воскового нальоту); знімання верхнього шару лусок бруньки; промивання експлантантів 24 год. протічною водою з господарським милом (для видалення механічних домішок); занурення на 15 хв. у 30 %-й розчин хлорки; занурення на 10 сек. у 70 %-й етанол; занурення на 15 сек. у 2 %-й розчин перекису водню; занурення на 10 хв. у 0,2 %-й нітрат срібла. Після обробітку кожним реагентом потрібно виконувати триразове промивання стерильною дистильованою водою. Перед пасажом для ініціації експлантанти 10-15 сек. Треба витримати у 10 %-му розчині антибіотика "Цефазолін-КМП".

## Література

1. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения / Р.Г. Бутенко // Культура клеток растений и биотехнология. – М. : Изд-во "Наука", 1986. – С. 3-20.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М. : Изд-во "Наука", 1964. – 272 с.
3. Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение растений / В.А. Высоцкий // Культура клеток растений и биотехнология. – М. : Изд-во "Наука", 1986. – С. 91-102.
4. Гречаник Р.М. Мікроклональне розмноження бука лісового / Гречаник Р.М., Базюк О.Ф., Каганяк Ю.Й., Гриник Г.Г. // Науковий вісник УкрДЛТУ : Лісівницькі дослідження в Україні. – Львів : УкрДЛТУ. – 2000. – Вип. 10.4. – С. 137-142.
5. Гречаник Р.М. Підбір експлантатів бука лісового (*Fagus sylvatica* L.) та режиму їх стерилізації у мікроклональному розмноженні : матер. Міжнар. наук.-техн. конф. / Р.М. Гречаник, Г.Г. Баранецький, О.Ф. Базюк. – Львів : УкрДЛТУ. – 2001. – С. 195-197.
6. Гузь М.М. Сучасний стан генофонду бука лісового (*Fagus sylvatica* L.) на Львівщині / М.М. Гузь, Р.М. Гречаник, М.М. Лісовий // Науковий вісник НЛТУ України : зб. наук.-техн. праць. – Львів : РВВ НЛТУ України. – 2009. – Вип. 19.7. – С. 44-51.
7. Гузь М.М. Використання поліморфізму бука лісового в зеленому будівництві // Екологія – шляхи гармонізації відносин природи та суспільства : тези міжвуз. наук. конф. / М.М. Гузь, Р.М. Гречаник, М.М. Лісовий. – Умань, 2009. – С. 92-94.
8. Калинин Ф.Л. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук / под ред. Ф.Л. Калинина. – К. : Вид-во "Наук. думка", 1980. – 488 с.
9. Мельник Ю.А. Формове різноманіття бука лісового на Львівщині / Ю.А. Мельник, Р.М. Гречаник, М.М. Лісовий // Науковий вісник УкрДЛТУ : зб. наук.-техн. праць. – Львів : УкрДЛТУ. – 2003. – Вип. 13.3. – С. 56-62.
10. Ahuja M.R. A commercially feasible micro-propagation methods for aspen / M.R. Ahuja // *Silvae Genet.* – 1984. – № 33. – P. 174-176.
11. Chalupa V. In vitro propagation of *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Quercus*, *Fagus* and other species using adenine – type cytokinins and thidiazuron / V. Chalupa // *Commun. Inst. For. Czech.* – 1985. – № 14. – P. 65-90.

УДК 579.26:630\*164.8:582.475.4

Проф. А.Ф. Гойчук<sup>1</sup>, д-р с.-г. наук;

проф. Р.І. Гвоздяк<sup>2</sup>, д-р біол. наук; гол. спец. В.В. Розенфельд<sup>3</sup>, канд. біол. наук;

наук. співроб. Л.М. Ващенко<sup>2</sup>, канд. біол. наук

## МІКРОБНА ГЕТЕРОГЕННІСТЬ НАСІНИН СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ

Наведено результати вивчення епіфітної та ендоефітної мікрофлори здорового насіння сосни звичайної. Досліди виконано з окремими насінинами та їхньою масою (наважка – 1 г). У 1 г насіння сосни звичайної виявлено 220-280 тис. колоній утворювальних одиниць (КУО) мікроорганізмів. Вони представлені здебільшого спороутворювальними (*Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Bacillus* sp., *Paenibacillus polymyxa*) і неспороносними (*Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora*, *Enterobacter nimipressuralis*, *Pantoea agglomerans*) бактеріями та грибами із родів *Mucor*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicilium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Torula*. Найменше на (в) насінні целюлозоруйнівних, олігонітрофільних та фітопатогенних бактерій. Розрахунково їхня кількість становить 2-20 КУО на 1 насінину.

Гетерогенність здорового насіння за заселенням його мікробіотою виявлено серед епіфітів та ендоефітів за ознакою інтенсивності росту на поживних середовищах домінуючих груп бактерій і грибів, різної їх чутливості до пестицидів, адгезії до поверхні насіння незалежно від його походження та посівних властивостей.

<sup>1</sup> Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

<sup>2</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, м. Київ

<sup>3</sup> Департамент аграрної освіти, науки та консультування, Міністерство аграрної політики України, м. Київ