Науковий вісник НЛТУ України
Scientific Bulletin of UNFU
https://doi.org/10.36930/40340104
Article received 25.01.2024
Article accepted 29.01.2024
UDC 57.085.2:602:582.622
Correspondence author: Yu. S. Lysak, lysyust@gmail.com
ISSN 1994-7836 (print)
ISSN 2519-2477 (online)

Ю. С. Лисак

Український ордена "Знак Пошани" науково-дослідний інститут лісового господарства та агролісомеліорації ім. Г. М. Висоцького, м. Харків, Україна

СПОСОБИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРОЦЕСУ ДЕКОНТАМІНАЦІЇ ПЕРВИННИХ ЕКСПЛАНТІВ ФУНДУКА ПІД ЧАС КЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ В УМОВАХ *IN VITRO*

Проведено дослідження із підвищення ефективності методу клонального розмноження фундука сортів 'Велетень' та 'Харків-4' шляхом живцювання, за рахунок удосконалення процесу деконтамінації матеріалу. Застосовано метод вирощування материнських рослин на підготовленому ґрунті в умовах закритого середовища із контролем живлення та параметрів середовища для отримання донорського матеріалу з більш високим ступенем мікробіологічної чистоти. Досліджено ефективність застосування антисептичних препаратів: "Мірамістин", "Горостен", "Dequadin" та дезінфікуючого засобу "Лізоформін 3000" у процесі мікробної деконтамінації експлантів фундука. Досліджено ефективність поєднання первинної поверхневої стерилізації експлантів із застосуванням стерилянтів на першому та другому етапах оброблення: перекис водню, етанол, гіпохлорит натрію та наступної деконтамінації із використанням антисептичних препаратів і дезінфікуючого засобу, на третьому етапі. Отримано наступні результати: найнижчі показники контамінації сапрофітними мікроміцетами спостерігались при поєднанні первинної стерилізації із застосуванні 0,5 % розчину "Лізоформін 3000": отримано 7,57-12,01 % контамінованих рослин за тривалість експозиції 5 хв, та 10,04-12,0 % за тривалість експозиції 10 хв. Застосування препарату "Мірамістин" при поєднанні із первинною поверхневою стерилізацією дало змогу отримати показники контамінації на рівні 22,85-32,14 % та 28,28-32,80 % за 5 та 10 хв експозиції із препаратом відповідно. Застосування препаратів "Горостен" та "Dequadin", навіть після проведення первинної стерилізації, виявилось малоефективним, препарати не демонстрували фунгіцидну або фунгістатичну дію – 75,57-95,76 % контамінованих експлантів. Досліджено ефективність використання засобу "Лізоформін 3000" у процесі двох-етапного оброблення експлантів фундука – первинної стерилізації із застосуванням перекису водню та етанолу на першому етапі та наступної деконтамінації із використанням 0,25 % розчину "Лізоформін 3000" за тривалість експозиції 15 хв. Внаслідок цього було отримано знижені, порівняно із контролем, показники контамінації – 33,72 та 39,23 %%. Додатково проведено дослідження із знешкодження міцелію та спор у зразках із ознаками зараження сапрофітними мікроміцетами за допомогою використання 0,5 та 1,0 %% розчинів засобу "Лізоформін 3000". На 15 добу культивування після процедури оброблення отримано 45,22-51,0 % експлантів без ознак зараження.

Ключові слова: асептична культура живців; мікробна контамінація; антисептичні препарати; дезінфікуючий засіб; стерилізація; сапрофітні мікроміцети.

Вступ / Introduction

У наш час – період інтенсивних кліматичних змін, серйозною проблемою стає збереження селекційно цінного генетичного матеріалу, тобто значимих з точки зору селекції сортів і форм деревних рослин. Також це стосується сортів фундука селекції попередніх років, оскільки у колекціях *in situ* маточні рослини можуть потерпати від негативної дії факторів зовнішнього середовища і матеріал для розмноження, отриманий від цінних екземплярів рослин-донорів може не мати належної якості [18].

При вегетативному розмноженні деревних і чагарникових форм рослин результат значною мірою залежить від якості похідного матеріалу. Тому великими селекційними центрами все частіше практикується вирощування материнських рослин в умовах закритого середовища. У тому числі застосовують методи клонування та тривалого культивування клонових рослин деревних і чагарникових видів на твердих субстратах із залучанням методів спочатку гідро-, а далі геопоніки, які мають на увазі регульовані умови вирощування, контроль живлення, вологості, температури та режиму освітлення [4, 10, 23].

Отримання рослинного матеріалу для розмноження належної якості від материнських рослин є складним завданням. Мікробне контамінування зразків, а саме спорами та конідіями мікроміцетів, є одним із значних біогенних факторів впливу на процес клонального розмноження та залежить від імунного статусу рослини, схильного до сезонних коливань [40].

Проблема мікробіологічної чистоти донорського матеріалу та підтримання материнських рослин у стадії активної вегетації, незалежно від сезону, може вирішуватись культурою маточних рослин у закритих умовах із контролем живлення та усіх параметрів середовища. Регульовані умови зростання донорських рослин на

Інформація про автора:
Лисак Юлія Станіславівна, мол. наук. співробітник, відділ селекції, генетики та біотехнології. **Email:** lysyust@gmail.com; https://orcid.org/0009-0003-6912-7763

Цитування за ДСТУ: Лисак Ю. С. Способи підвищення ефективності процесу деконтамінації первинних експлантів фундука під час клонального розмноження в умовах *in vitro*. Науковий вісник НЛТУ України. 2024, т. 34, № 1. С. 27–35.
Citation APA: Lysak, Yu. S. (2024). Ways of increasing the efficiency of the process of decontamination of primary hazelnut explants during clonal propagation *in vitro*. *Scientific Bulletin of UNFU*, 34(1), 27–35. https://doi.org/10.36930/40340104

твердих субстратах, звільнених від ґрунтових патогенів, можливо створити за допомогою застосування сучасних гідро- та геопонних систем безперервного циклу, розроблених саме для деревних рослин, що забезпечують вихід великої кількості зелених напівздерев'янілих живців, протягом всього року [8, 10, 23, 35].

Можливо, що поєднання технології вирощування маточних рослин фундука із застосуванням систем гідро- та геопоніки, тобто, на спеціально підготовлених субстратах та із контролем живлення, і методів клонального розмноження фундука в умовах *in vitro*, дасть змогу отримати похідні експланти зі зниженим рівнем контамінації, що дасть змогу підвищити ефективність методів стерилізації у процесі уведення експлантів до асептичних умов.

Отже, існує декілька стратегій боротьби із інфікуванням матеріалу, таких як: отримання від донорських рослин похідного біоматеріалу із більш високим ступенем чистоти; перешкоджання інфікуванню об'єктів, тобто потраплянню екзогенної мікробіоти у процесі введення експлантів до асептичної культури, за допомогою технік отримання матеріалу, первинного поверхневого знезараження та подальшої стерилізації похідного матеріалу; запобігання розвитку інфекції у процесі культивування від початку інфікованого матеріалу за допомогою пришвидшення морфогенетичного розвитку, зменшення тривалості окремих стадій процесу регенерування та усього циклу культивування, що проходить до моменту отримання рослини-регенераната. Скорочення кількості пасажів – є одним із шляхів перешкоджання розвитку інфекції в умовах *in vitro*.

Пришвидшений морфогенетичний розвиток експлантів є доволі ефективним методом захисту експлантів від розвитку інфекції. Відомо, що сформована мікророслина із листочком та корінням вже не потерпає від паразитичних і сапрофітних грибів, які розвиваються на культуральному середовищі, оскільки здатна пригнічувати розвиток патогенної мікрофлори за рахунок виділення у середовище власних антибіотичних речовин, що синтезуються у різних органах, особливо у період їх активного росту [5, 20, 28].

Наразі ведеться активний пошук нових дієвих способів підвищення власного імунітету рослин в умовах *in vitro*. Використання низькомолекулярних антибіотичних речовин різного класу, фітоалексинів, рослинних лектинів у процесі МКР все більше набуває популярності [1, 5, 20, 24, 26, 27, 28, 36].

Зважаючи на викладене вище, для удосконалення процесу деконтамінації експлантів фундука і для подальшого клонального розмноження виникає потреба у: зниженні рівня контамінації первинних експлантів шляхом пошуку ефективних технік підготовки та отримання донорського матеріалу, методу стерилізації експлантів.

Об'єкт дослідження – підготовки та уведення до асептичної культури *in vitro* живців *Corylus maxima* Mill.

Предмет дослідження – методи і засоби визначення мікробної деконтамінації із застосуванням різних класів стерилізуючих речовин і антисептичних препаратів для отримання асептичних експлантів у процесі клонального розмноження *Corylus maxima* Mill.

Мета роботи – удосконалити процес деконтамінації експлантів *Corylus maxima* Mill. шляхом застосування технік отримання та підготовки донорського матеріалу, підбору антисептичних препаратів і дезінфікуючих засобів різного класу із високою герміцидною або бактеріо- та фунгістатичною ефективністю та низькою цитотоксичністю, і їх використання у поєднанні із процедурою первинного поверхневого знезараження із застосуванням речовин-стерилянтів.

Для досягнення зазначеної мети визначено такі основні *завдання дослідження:*

1) дослідити ефективність використання біологічного матеріалу, отриманого із рослин-донорів різних сортів фундука, культивування яких відбувалося у закритих умовах;
2) дослідити вплив концентрацій та тривалості експозиції антисептичних препаратів і дезінфікуючих засобів на ефективність їх дії у процесі поверхневого знезаражуючого оброблення матеріалу шляхом оцінювання рівня контамінації стеблових живців впродовж їх культивування на поживному середовищі в умовах *in vitro.*

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Швидка регенерація рослин при клональному розмноженні значною мірою залежить від рівня контамінації експлантів [19, 25].

Деякі методи мікроклонального розмноження МКР (англ. *Methods of Microclonal Propagation*), засновані на прямому морфогенетичному розвитку, наприклад, культура пагонів, передбачають використання великих за розмірами первинних експлантів. Але зі збільшенням розміру біооб'єкту, і збільшенням контамінування поверхні, стає важчим досягти асептичних умов культивування у закритому середовищі.

Технологія живцювання фундука в умовах *in vitro* відносно простий і надійний спосіб клонального розмноження, але її складність полягає у тому, що завдяки відносно великим розмірам живців, які вводять до культури, ускладнюється процес їх стерилізації. Тому септичність вихідного, тобто первинного експланту, який піддають довготерміновому контакту із поживним середовищем, що містить відносно високу концентрацію цукрів, є доволі високою. А це водночас може спричинити стрімкий та бурхливий розвиток патогенної або умовно-патогенної мікробіоти у процесі тривалого культивування в умовах *in vitro* [25].

У більшості випадків процес введення живців деревних і чагарникових форм рослин до асептичної культури потребує багатоетапного первинного поверхневого оброблення стерилізуючими або дезінфікуючими засобами. Основними речовинами, які використовують у процесі знезараження рослинного матеріалу, є гіпохлорит натрію та кальцію, а також інші хлорвмісні сполуки, етанол, глутаровий альдегід, четвертинні амонієві сполуки, тощо [7, 15, 17, 30, 33, 39, 42]. У останні роки з'явилась можливість замінити використання солей гіпохлориту із високим ступенем пошкоджувальної дії на живі тканини, на гіпохлорит (гіпохлоритну кислоту). І хоча гіпохлоритна (хлорнуватиста) кислота є безпечною для біологічних об'єктів, але дуже нестійкою сполукою, зараз виробляються антисептики та дезінфікуючі засоби на базі більш стійких розчинів гіпохлоритної кислоти із терміном зберігання до 2 років.

Потрапляння мікробіоти з поверхні експлантів у середовище культивування та її стрімкий розвиток є основною проблемою процесу культивування *in vitro*, пов'язаною із контамінацією рослинного матеріалу. Плісняві гриби – у більшості сапрофітні та паразитичні мікроміцети. Основними представниками пліснявих

грибів є роди *Penicillium*, *Aspergillum* та *Fusarium*. Сапрофітні мікроміцети, до яких належать *Aspergillus niger, A. flavus, Penicillium spp, Saccharomyces cerevisiae* здатні пригнічувати ріст та розвиток експлантів. Деякі види аспергілл є фітопатогенними, продукуючи афлатоксини, вони чинять фітотоксичний ефект. Процес деконтамінації рослинного матеріалу також ускладнюється тим, що гриби роду *Aspergillum* мають виражену стійкість до оброблення різними протигрибковими препаратами [11, 25, 40].

Класичні методи поверхневого знезараження рослинного біологічного матеріалу під час отримання асептичних експлантів у процесі мікроклонального розмноження базуються на використанні високотоксичних солей ртуті, срібла та міді [6, 39, 41, 42]. Але й на даний час використання складних багатоетапних методів оброблення рослинних біооб'єктів перед їх введенням до культури *in vitro* із використанням токсичних сполук, які наносять шкоду довкіллю та здоров'ю людини, забруднюючи стічні води та потребують складних способів дезактивації, іноді є малоефективним. У сучасних протоколах все більше використовують порівняно безпечні речовини із бактерицидною та фунгіцидною дією.

За останні 20 років, не дивлячись на давно розроблені та чітко затверджені протоколи із знезараження біооб'єктів, велика кількість лабораторій мікроклонального розмноження у світі здійснювала пошук альтернативних методів і засобів, відмовляючись від використання солей ртуті у процесі деконтамінації матеріалу, та замінюючи їх на стерилянти та деконтамінанти на базі четвертинних амонієвих сполук, такими, як бензалконію хлорид, антимікробними сумішами на базі ізотіазолінонів, наприклад біоцид PPM (англ. *Plant Preservative Mixture*), похідними янтарної кислоти, антибіотиками групи цефалоспоринів або антибіотиками із протигрибковою активністю, такими як амфотерицин В – представник класу поліенових антибіотиків, антибактеріальними препаратами рослинного походження, такими як "Іманін", тощо [21, 30, 33, 37, 38, 43, 44].

Зараз широко використовують контактні та системні фунгіциди у процесі підготовки донорського рослинного матеріалу. У своїй роботі М. М. Араб та ін. (2017) застосовують оброблення фрагментів пагонів розчинами системного та контактного фунгіцидів широкого спектру дії – "Беноміл" з класу бензимідазолів і "Каптан" [4].

Також, проводять дослідження із підвищення ефективності процесу деконтамінації матеріалу шляхом оптимізації технології отримання донорського матеріалу фундука. Так у роботі Ч.Р. Хєнд та ін. (2016) у процесі дослідження залежності ефективності технік поверхневого знезараження експлантів *C. avellana* L. було встановлено, що життєздатність та рівень мікробної контамінації експлантів залежать від способу заготівлі донорського матеріалу, оскільки положення вузлового сегменту із брунькою на пагоні чинить значний вплив на подальший успіх деконтамінації [12].

Культивування маточних рослин у закритих умовах для отримання матеріалу, що використовується для потреб технології мікроклонального розмноження, вже практикується деякими лабораторіями. Наприклад, у роботі М. М. Араб та ін. (2017) представлено системний підхід зі зниження рівня контамінованості рослинного матеріалу *Prunus dulcis* Mill., одним із пунктів якого є вирощування маточних рослин у ізольованих умовах теплиці [4]. У своїй роботі Р. П. Пінцеллі-Соуза та ін. (2018) у процесі мікроклонального розмноження *C. Americana* Marshall також вдалося знизити рівень контамінації експлантів за рахунок використання донорського матеріалу, отриманого з маточних рослин, культивування яких проводилось у закритих умовах теплиці [38]. В. В. Мацкевичем. (2020) запропоновано вирощування маточних рослин фундука – донорів первинних експлантів для клонального розмноження, в умовах закритого грунту [33].

Одним із шляхів зниження рівня контамінації та перешкоджання потраплянню і розвитку екзогенних мікроорганізмів, тобто з ціллю уникнення повторного інфікування впродовж культивування, є скорочення кількості пасажів на окремих стадіях процесу клонального розмноження.

У деяких випадках скорочення кількості пасажів, кожен з яких супроводжуються заміною поживного середовища, впродовж тривалого культивування може призвести до підвищення концентрації фенольних сполук у поживному середовищі [9, 22, 29]. Хоча для ряду калусних культур різних видів рослин, навпаки, відзначено збільшення накопичення фенольних сполук в ході їх пасирування за рахунок підвищення інтенсивності генерування продуктів окислення фенолів внаслідок стресу [9, 13, 16, 29]. Вивільнення фенольних сполук із пошкоджених тканин ізольованого експланту у середовище культивування є однією із істотних проблем клонального розмноження деревних порід [9, 22, 29]. Оскільки вплив фенолів стосується систем пов'язаних із синтезом або дією фітогормонів [14, 34].

Збільшений вміст фенольних метаболітів у середовищі є характерним для культивування представників родини *Betulaceae*, зрілі тканини яких містять ці сполуки у більшій концентрації, ніж тканини інших деревних рослин [25]. *Корічні кислоти* – попередники лігніну, який інкрустує целюлозні фібрили, починають активно утворюватись у відповідь на механічне пошкодження рослинних тканин. Синтез фенолів супроводжується окислювальною конденсацією. Внаслідок цього оксикорічні, оксибензойні кислоти та оксибензойні спирти формують полімери раньового лігніну, щоб утворити захисний шар [3, 14]. Існують дані, що присутність у середовищі культивування білків міцелію сапрофітних грибів викликає підвищення продуктів окислення фенольних сполук [2, 9, 16]. Це ускладнює процес регенерування експлантів з причин зниження інтенсивності ризогенезу, оскільки о-, р-фенольні сполуки можуть впливати на ростові процеси, виступаючи у ролі інгібіторів росту [2, 14]. Відомо, що окислені форми фенолів інгібують поділ та ріст клітин меристематичних тканин, що призводить, або до поступової загибелі експлантів, або істотного зменшення здатності тканин до регенерування адвентивних бруньок [14]. Наприклад, кверцетин і кемпферол інгібують активність білків транспорту ауксинів між клітинами, а також, активуючи ІОК-оксидазу, знижують рівень індоліл-3-оцтової кислоти. Внаслідок цього відбувається гальмування шляхів ауксинової регуляції, а також сповільнення ростових процесів, за рахунок гальмування поділу та розтягнення клітин [14, 34]. Отже, в такий спосіб здійснюють вплив на морфогенез експлантів.

Але існує і зворотній зв'язок між присутністю екзогенних фітогормонів різного типу у середовищі та секрецією фенольних сполук. Дослідження залежності вмісту фенольних сполук у культурі тканин *in vitro* від типу екзогенного фітогормона у середовищі показали, що в калусах *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers. при застосуванні різних ауксинів вміст розчинних фенольних сполук (флавоноїдів і катехінів) був нижчим у присутності 2,4-Д та НУК, а у випадку застосування цитокінінів, у присутності кінетина і БАП калуси журавлини виробляли і накопичували менше фенольних сполук ніж за використанням інших цитокінінів [14].

Для зниження токсичної дії продуктів окиснення фенолів (ПОФ) у поживне середовище додають такі речовини-сорбенти, як полівінілпіролідон та активоване вугілля [17, 25].

Матеріали та методи дослідження. Експерименти із клонального розмноження фундука здійснювали на базі лабораторії селекції (зараз біотехнологічна лабораторія відділу генетики, селекції та біотехнології) УкрНДІЛГА.

Для дослідження використано фрагменти стебла із однією сплячою пазушною брунькою довжиною 20-30 мм, отримані із частин однорічних пагонів довжиною 15-20 см, отриманих від 2-5 річних рослин-донорів *C. Maxima* Mill. сортів 'Велетень', 'Харків-4', для вирощування яких застосовувались геопонні системи із використанням спеціально підготованих твердих субстратів, звільнених від ґрунтової патогенної, умовно-патогенної та сапрофітної мікробіоти, та контролю живлення та параметрів середовища. Пагони перебували у фазі активної вегетації.

Культивування експлантів здійснювали, дотримуючись умов освітлення, температури, вологості відповідно до існуючих стандартів для виконання біотехнологічних методів, на рідкому або агаризованому поживному середовищі WPM (англ. *Woody Plant Medium*) із модифікованим складом [32].

Для підготовки маточних рослин до вилучення матеріалу, пагони, з яких проводили заготівлю живців, за 5 діб до нарізання обробляли шляхом обприскування 0,05 % розчином біологічного фунгіциду "Фитоспорин-М" для зменшення ступеню інфікування тканин.

На етапі підготовки до фрагментації матеріалу, отриманого з відібраних маточних рослин, живці довжиною 20-40 см, одразу після їх відокремлення від пагонів донорських рослин, видалення в них листя та обприскування сумішшю з 3 % розчину перекису водню та 70 % розчину етилового спирту, занурювали поверхнями відрізів у водний розчин антиоксидантів: 0,005 % аскорбінової кислоти та 0,005 % лимонної кислоти, у якому витримували впродовж однієї доби в умовах високої вологості, низьких позитивних температур (5-10 °С) та відсутності світла.

Після однієї доби живці вилучали з холодного приміщення та швидко занурювали у теплий (25 °С) водний розчин 1 % аскорбінової кислоти на 60 сек. Далі живці поміщали у теплу (50 °С) воду на 90 с, для ініціювання теплового шоку, після чого промивали під струменем теплої (50 °С) води впродовж 60 с.

Стерилізацію рослинного матеріалу перед введенням у культуру *in vitro* здійснювали за допомогою комбінованого методу із застосуванням дезінфектантів і антисептичних речовин герміцидної та бактеріостатичної дії, шляхом 3-етапного поверхневого оброблення рослинного матеріалу з 3-кратним промиванням водою після кожного оброблення. 1 етап: занурення на 1 хв у суміш розчинів 3 % перекису водню та 70° етилового спирту. 2 етап: занурення на 10 хв у 10 % водному розчині гіпохлориту натрію. 3 етап – експозиція 5 та 10 хв у розчині одного із наступних антисептичних і дезінфікуючих препаратів: "Мірамістин" – 0,01 % розчин на базі бензилдиметил-мірістоїламіно-пропіламонійхлориду, "Горостен" – 0,025 % розчин на базі декаметоксина дихлориду, "Dequadin" – 0,5 % розчин на базі деквалінія хлориду, "Лізоформін 3000" – 0,5 % водний розчин на базі глутарового альдегіду, гліоксалю, дидецилдиметиламоній хлориду.

Відокремлення експлантів здійснювали у об'ємі водних розчинів антиоксидантів: 0,01 % розчин аскорбінової кислоти +0,01 % розчин лимонної кислоти, для уникнення проникнення повітря у судини живця, а також запобігання дії гідролітичних ферментів і утворення продуктів окислення фенольних сполук.

Культивування ізольованих експлантів впродовж перших 5 діб, на стадії їх адаптації, здійснювали на рідкому поживному середовищі із високим вмістом сахарози як донора вуглецю – 0,1 моль/л, для забезпечення більшої доступності трофічних елементів, та для більш раннього виявлення перших ознак розвитку сапрофітних грибів і іншої мікробіоти у середовищі. Першу добу після ізолювання культивування експлантів проводилось за відсутності світла, для зменшення інтенсивності утворення АФК внаслідок оксидативного стресу і запобігання фотоокислення карбонілвмісних полімерів.

Ефективність використання у процесі отримання стерильної культури експлантів вищезазначених фармакологічних препаратів і дезінфікуючих засобів, ступінь цитотоксичної дії компонентів вищезазначених антисептичних препаратів і дезінфікуючих засобів, а також оптимальну тривалість експозиції оцінювали за двома показниками: життєздатність експлантів після 5 діб культивування та рівень контамінаціїї експлантів і їх поживних середовищ сапрофітними мікроміцетами на 15 добу культивування. Визначення рівня контамінації експлантів передбачає врахування кількості тих зразків (експлантів або їх поживних середовищ), в яких спостерігається розвиток та ріст міцелію сапрофітних мікроміцетів впродовж перших 15 діб культивування.

Для визначення істотності різниці між дослідом і контролем використовували критерій Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення / Research results and their discussion

У проведеному дослідженні була спроба удосконалити метод стерилізації експлантів фундука перед введенням їх у асептичну культуру *in vitro* для того, щоб мати можливість підвищити ефективність процесу деконтамінації без застосування ртутьвмісних сполук.

Для цього як деконтамінанти рослинного матеріалу використовували, окрім загальноприйнятих речовин-стерилянтів, дезінфікуючі засоби та антисептичні препарати з широким спектром бактерицидної та фунгіцидної дії, що використовують у медицині та фармакології. Визначали ефективність поєднання первинного оброблення із застосуванням перекису водню, етанолу та гіпохлориту натрію та подальшої деконтамінації із застосуванням антисептичних препаратів та дезінфікуючих засобів.

Одним із завдань було визначити ефективність використання препаратів у обраних концентраціях та за обраної тривалості експозиції шляхом оцінювання життєздатності та рівня контамінації експлантів. Результати наведено у табл. 1, де показано середні арифметичні значення показників і стандартні статистичні похибки середніх арифметичних значень показників.

Табл. 1. Ефективність використання препаратів у процесі введення експлантів фундука до стерильної культури / Effectiveness of the use of drugs in the process of hazelnut explants introduction into a sterile culture

Назва препарату	Назва сорту			
	Велетень		Харків-4	
	Ж, %	К, %	Ж, %	К, %
Тривалість експозиції – 5 хв				
Мірамістин	$97,86^{\pm1,46}$	$32,14^{\pm4,63*\#}$	$96,08^{\pm2,71}$	$22,85^{\pm6,58*\#}$
Горостен	$96,29^{\pm3,25}$	$86,0^{\pm8,16}$	$96,74^{\pm2,11}$	$75,57^{\pm5,74*\#}$
Dequadin	$98,34^{\pm0,91}$	$95,76^{\pm3,42}$	$97,0^{\pm2,73}$	$90,68^{\pm6,16}$
Лізоформін 3000	$98,55^{\pm0,29}$	$7,57^{\pm2,48*\#}$	$97,19^{\pm1,45}$	$12,01^{\pm4,32*\#}$
Тривалість експозиції – 10 хв				
Мірамістин	$64,0^{\pm9,40*\#}$	$28,28^{\pm4,85*\#}$	$72,36^{\pm4,21*\#}$	$32,80^{\pm5,94*\#}$
Горостен	$92,68^{\pm3,37}$	$79,47^{\pm5,0*\#}$	$92,98^{\pm3,09}$	$88,86^{\pm1,53*\#}$
Dequadin	$94,26^{\pm5,46}$	$91,18^{\pm6,33}$	$94,0^{\pm2,20}$	$85,0^{\pm5,19\#}$
Лізоформін 3000	$78,32^{\pm5,99*\#}$	$12,0^{\pm1,70*\#}$	$67,39^{\pm7,10*\#}$	$10,04^{\pm0,38*\#}$
$К_1$ – 1-ий та 2-ий етапи оброблення	$97,18^{\pm2,23}$	$96,09^{\pm1,11}$	$96,88^{\pm1,04}$	$93,28^{\pm0,50}$
$К_2$ – інтактні експланти	$99,14^{\pm0,21}$	$96,76^{\pm2,19}$	$98,59^{\pm1,10}$	$98,44^{\pm0,18}$

Примітка: * – різниця достовірна за відношенням до $К_1$ при $P \le 0,05$; # – різниця достовірна за відношенням до $К_2$ при $P \le 0,05$; Ж – життєздатність; К – контамінація.

Для оцінювання ефективності процесу деконтамінації використовували відсоткові показники життєздатності (відносна до загальної кількості кількість живих експлантів без ознак некрозу тканин) та контамінації (відносна кількість контамінованих експлантів), які порівнювали з двома контрольними групами експлантів. Для перевірки загальної ефективності процесу деконтамінації, який містить процедуру первинної (на 1-му та 2-му етапах) та вторинної (на 3-му етапі) стерилізації використовували контроль № 1 ($К_1$) – група інтактних експлантів. Для виключення вірогідності ураження тканин експлантів внаслідок дії стерилізуючих речовин на 1-му та 2-му етапах оброблення та дослідження ефективної дії саме антисептичних препаратів і дезінфікуючого засобу, які було застосовано на 3-му етапі процедури знезараження шляхом порівняння, слугував контроль № 2 ($К_2$) – група експлантів після 2-етапного оброблення розчинами перекису водню, етилового спирту та гіпохлориту натрія.

Частка життєздатних експлантів визначалась ступенем токсичної дії препаратів у концентраціях, що використовувались, за наданою тривалістю експозиції. Частка експлантів з ознаками контамінації – показник ступеню зараженості тканин вихідних експлантів і їхнього поживного середовища, а також ефективності застосування наданих концентрацій препаратів впродовж наданої тривалості експозиції.

В процесі пошуку ефективної концентрації препаратів використовували показники життєздатності для визначення найвищої граничної ефективної концентрації препаратів, за перевищенням якої токсична дія їх складових речовин не дає змоги отримувати достатню кількість життєздатних експлантів. А також використовували рівень контамінації – показник для визначення нижчої межі концентрації препаратів, за якою препарат вже не є ефективним.

Як видно із табл. 1, контакт з усіма антисептичними препаратами та дезінфікуючим засобом на 3-му етапі стерилізації експлантів тривалістю, що не перевищує 5 хв, не чинить пошкоджувальної дії на тканини експлантів усіх сортів фундука.

Збільшення тривалості експозиції до 10 хв для препарату "Мірамістин" та засобу "Лізоформін 3000" чинить негативний вплив на показники життєздатності експлантів. Але препарати "Горостен" та "Dequadin" не виявляють токсичної дії навіть при більш тривалому контакті. Проте разом із тим ефективність використання препаратів "Горостен" та "Dequadin" у представлених концентраціях впродовж обраної тривалості експозиції низька для експлантів усіх сортів. Про це свідчить високий рівень контамінації, який не знижується навіть при збільшені тривалості контакту з препаратами до 10 хв і становить не менш 75 %.

Препарат "Мірамістин" та засіб "Лізоформін 3000" навпаки виявляють герміцидну дію за тривалість контакту у 5 хв. Фунгіцидна дія "Мірамістину" та "Лізоформіну 3000" майже не залежить від тривалості експозиції, оскільки рівень контамінації грибами у варіантах з експозицією як 5, так і 10 хв коливається у межах 22,85-32,80 % для "Мірамістину" та 7,57-12,01 % для "Лізоформіну 3000".

Для більшої наочності отриманих даних з ефективності застосування препаратів/засобів було розраховано кількісний показник ефективності – середній відсоток експлантів обох сортів без ознак контамінації після 5-хв експозиції у одному з наступних препаратів/засобів: для "Мірамістину" показник ефективності дорівнював 72,5 %, для "Горостену" – 19,2 %, для препарату "Dequadin" – 6,8 %, для засобу "Лізоформін 3000" – 90,2 %.

На рисунку представлено результати розрахунків середньої частки експлантів обох сортів без ознак контамінації після 5-хв експозиції у одному з препаратів/засобів.

Рисунок. Діаграма розподілу ефективності застосування препаратів / Diagram of the distribution of the effectiveness of the use of drugs

Засіб "Лізоформін 3000" завдяки тому, що містить у своєму складі глутаровий альдегід відрізняється високою токсичністю у концентраціях більших за 1 % його водного розчину. Відповідно до Інструкції щодо використання засобу дезінфікуючого "Лізоформін 3000 (Lysoformin 3000)" для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації, розробленій Державною установою "Інститутом медицини праці ім. Ю. І. Кундієва Національної академії медичних наук України", за участю ТОВ "Бландіас" Україна, використовують концентрації робочих розчинів за препаратом від 0,1 до 1,0 % для режимів дезінфекції виробів медичного приз-

начення, медичних об'єктів і інструментарію і тільки для режиму стерилізації інструментарію застосовують розчин у концентрації 8,0 %.

Уперше дія засобу "Лізоформін 3000" досліджувалась Ю. С. Лисак (2017) при клональному розмноженні тополі Боллє [31]. Водний розчин засобу у концентрації 0,25 % виявив високу ефективність у процесі деконтамінації матеріалу та низьку токсичну дію.

У подальших роботах вивчався вплив "Лізоформіну 3000" як поверхневого стерилізанту в процесі отримання асептичних експлантів горіха волоського, за використанням розчину препарату у концентрації 10 % та тривалості експозиції 5-15 хв. Внаслідок цього було отримано велику частку некротизованих експлантів і відзначено низьку ефективність засобу завдяки високому ступеню контамінації матеріалу у процесі наступного культивування [41].

У представленому досліді із деконтамінації експлантів фундука за використанням "Лізоформіну 3000", при контакті тканин із засобом впродовж 10 хв ознаки токсичної дії складових засобу мали місце навіть за його концентрації 0,5 %, що виявлялося у зниженні життєздатності експлантів на 20,23-29,8 % порівняно із показниками життєздатності після 5-ти хвилинної експозиції. Було продемонстровано високу некротизуючу дію засобу на тканини експлантів.

Отримані результати використання препаратів на базі активних речовин, що виявляють фунгіцидну та бактерицидну/бактеріостатичну дію, дають можливість також зробити припущення, що сапрофітна мікробіота зразків, в яких спостерігались ознаки зараження після 15 діб культивування, виявляла чуттєвість до дії препаратів, але у цих випадках дія була не фунгіцидною, а носила більш фунгістатичний характер, тобто за наданою концентрацією препарати тільки тимчасово пригнічували розвиток мікроміцетів і їхніх спор, а не повністю знищували їх. Також можливо не була достатньою тривалість контакту рослинних тканин із дезинфікуючими та антисептичними речовинами.

Додатково було проведено два досліди із вивчення ефективності "Лізоформіну 3000": експеримент № 1 – дослідження ефективності використання Лізоформіну 3000 на 2 етапі деконтамінації, замість гіпохлориту натрію, за двоетапного оброблення; експеримент № 2 – дослідження ефективності використання "Лізоформіну 3000" для оброблення зразків (експлантів і їх поживних середовищ), контамінованих сапрофітними мікроміцетами родів *Penicillium* та *Aspergillum*, із ознаками розвитку міцелію пліснявих грибів на 15 добу культивування.

У першому експерименті було застосовано двоетапне поверхневе оброблення з трикратним промиванням водою після кожного оброблення. На першому етапі проводили очищення поверхні та первинне знезараження шляхом занурення живців на 1 хв у суміш розчинів 3 % перекису водню та 70° етилового спирту. Другий етап – занурення на 15 хв у 0,25 % водний розчин "Лізоформіну 3000".

Концентрація розчину "Лізоформін 3000" була знижена, порівняно із концентрацією (0,5 %) за його використанням у процесі 3-етапного оброблення, оскільки збільшення тривалості контакту експлантів із засобом до 15 хв може збільшувати його токсичний ефект.

Використання 2-етапного оброблення із застосуванням "Лізоформіну 3000" дало змогу отримати відносно низький рівень контамінації – 33,72 та 39,23 %%, тоді як використання гіпохлориту натрію на 2 етапі оброблення ($К_1$ у табл. 1) демонструвало низьку ефективність – 96,09-93,28 % контамінованих рослин. Тобто вдалося знизити рівень контамінації на 62,37 та 54,05 %% порівняно із контролем 1. Життєздатність експлантів впродовж 5 діб після застосування 0,25 % розчину "Лізоформіну 3000" була на рівні контролю 1 та 2 (див. табл. 1) – 97,0-98,25 %.

Ефективність використання "Лізоформіну 3000" замість гіпохлориту натрію на 2 етапі оброблення, тобто ефективність поєднання використання засобу із первинним знезараженням за допомогою перекису водню та етанолу, потребує подальшого вивчення для того, щоб мати можливість відмовитись у перспективі від застосування стерилянтів на базі сполук із активним хлором.

Оскільки процедура деконтамінації первинних експлантів має на увазі в основному тільки процеси знешкодження або пригнічення розвитку спор та конідій мікроміцетів на поверхні експлантів, для перевірки ефективності дії "Лізоформіну 3000" у процесі знешкодження мікроміцетів на стадії утворення та активного розвитку міцелію, було застосовано більші, порівняно із іншими експериментами, концентрації засобу. У другому експерименті для знешкоджувального оброблення зразків із ознаками зараження сапрофітними грибами використовували дві концентрації розчинів засобу "Лізоформін 3000" – 0,5 та 1,0 %% і тривалість експозиції експлантів із засобом – 2 хв. Внаслідок цього, на 15 добу культивування після оброблення результатів було досягнуто 45,22-51,0 % експлантів без ознак зараження мікроміцетами. Життездатність експлантів була на рівні 98,78-99,17 %.

Обговорення результатів дослідження. Потрібно зазначити, що В. В. Мацкевичем (2022), для зниження частки контамінованих первинних експлантів у процесі розмноження фундука шляхом мікроживцювання [30], було запропоновано вирощування маточних рослин ізольовано, в умовах закритого ґрунту і штучного освітлення та оброблення маточних рослин, перед отриманням донорського матеріалу, контактними і системними фунгіцидами. Також автором, у процесі деконтамінації експлантів, було застосовано для поверхневого оброблення гіпохлорит натрію та препарат "Бландіас 300" [33]. У роботі із мікроклонального розмноження *Juglans regia* L. Т. С. Риженко (2021) також було використано засіб "Лізоформін 3000" для поверхневого знезараження первинних експлантів [41]. Але використання засобу у концентрації 10 % та за тривалості експозиції 5-15 хв виявилось малоефективним з причин токсичної дії компонентів засобу та високого рівня контамінації: частка некротизованих експлантів становила 3-37 %, показники контамінації були на рівні 63-100 %, за 5-хв експозиції. Причому, збільшення тривалості експозиції до 10 та 15 хв не впливало на рівень контамінації, але збільшувало рівень некротизації експлантів [42].

Отже, за результатами виконаної роботи можна сформулювати такі наукову новизну та практичну значущість результатів дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів дослідження – вперше удосконалено метод деконтамінації первинних експлантів фундука за рахунок використання технології вирощування маточних рослин у закритих

умовах на геопонних системах, застосування антисептичних препаратів і дезінфікуючих засобів, що використовують у фармакології та медицині.

Практична значущість результатів дослідження – за рахунок підвищення ефективності методу деконтамінації у процесі клонального розмноження фундука, для підвищення показників життєздатності та регенерування експлантів, наданий метод має можливість конкурувати з іншими методами, які застосовують для отримання асептичних експлантів фундука у процесі введення їх до культури *in vitro*.

Висновки / Conclusions

Проведено оцінювання ефективності використання технології вирощування маточних рослин у закритих умовах та застосування препаратів і засобів бактерицидної і фунгіцидної дії, що використовують у фармакології та медицині для зниження показників контамінації експлантів, що дає можливість удосконалити окремі стадії процесу деконтамінації експлантів при клональному розмноженні фундука в умовах *in vitro*. За результатами проведеного дослідження можна зробити такі основні висновки.

1. Проведено досліди із підвищення ефективності процесу деконтамінації експлантів фундука за рахунок отримання біологічного матеріалу більшого ступеню мікробіологічної чистоти від рослин-донорів, культивування яких здійснюється у закритих умовах із контролем живлення та параметрів середовища. У процесі дослідження було встановлено, що використання геопонних систем із контролем живлення та параметрів середовища різного типу у процесі культивування материнських рослин фундука для безперервного отримання зелених живців для подальшого розмноження виділених з них експлантів в умовах *in vitro*, є доцільним і отриманий матеріал, який за якістю відповідає вимогам біотехнологічних методів, може використовуватись для потреб технології клонального розмноження фундука.
2. З'ясовано, що поєднання методів вирощування маточних рослин у закритих умовах на спеціально підготовлених твердих субстратах із застосуванням систем контролю живлення та параметрів середовища та їх клонального розмноження в умовах *in vitro* є доцільним для отримання клонових рослин і є здатним підвищити показники регенерування експлантів у процесі клонального розмноження фундука.
3. Досягнуто високих показників деконтамінації матеріалу та життєздатності експлантів у процесі знезараження поверхневих тканин експлантів фундука при їх введені до стерильних умов за рахунок поєднання методів первинного поверхневого знезараження із застосуванням таких стерилянтів, як перекис водню, етанол та гіпохлорит натрію і подальшої деконтамінації із застосуванням антисептичного препарату "Мірамістин" та дезінфікуючого засобу "Лізоформін 3000".
4. За використанням антисептичного препарату "Мірамістин" та дезінфікуючого засобу "Лізоформін 3000" і тривалості експозиції – 5 хв рівень контамінації експлантів сапрофітними грибами було знижено до 22,85-32,14 % та 7,57-12,01 % відповідно. При збільшені тривалості контакту експлантів із препаратами до 10 хв показники контамінації залишались на тому ж рівні: 28,28-32,80 % контамінованих експлантів при застосуванні "Мірамістину" та 10,04-12,0 % у випадку застосування "Лізоформіну 3000".
5. Встановлено, що використання таких речовин, як декаметоксину дихлорид та деквалінію хлорид у складі антисептичних препаратів "Горостен" та "Dequadin" не було ефективним, оскільки показники контамінації експлантів були на рівні 75,57-95,76 %% і не залежали від тривалості експозиції.

References

1. Ahuja, I., Kissen, R. M., & Bones, A. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73–106. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002
2. Alagarsamy, K., Shamala, L., & Wei, S. (2018). Influence of media supplements on inhibition of oxidative browning and bacterial endophytes of *Camellia sinensis* var. *sinensis*. *Biotech*, 8(8), 356. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1378-9
3. Ali, H., El-Gizawy, A., El-Bassiouny, R., & Saleh, M. (2015). Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products. *Journal of food science and technology*, 52(6), 3651–3659. https://doi.org/10.1007/s13197-0-1437-0
4. Arab, M. M., Yadollahi, A., & Ahmadi, H. (2017). Mathematical Modeling and Optimizing of *in vitro* Hormonal Combination for G×N15 Vegetative Rootstock Proliferation Using Artificial Neural Network-Genetic Algorithm (ANN-GA). *Frontiers in Plant Science*, 1(8), 1853. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01853
5. Belava, V. N., Panyuta, O. O., & Taran, N. Y. (2009). The role of lectins in the protective reactions of plants to phytopathogens. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*, *41*(3), 221–234. [In Ukrainian].
6. Chornobrov, O. Yu. (2017). Application of *in vitro* tissue culture methods for propagation of *Populus x Canadensis moench cultivars*. *Scientific Bulletin of UNFU*, *27*(6), 51–54. https://doi.org/10.15421/40270610
7. Chornobrov, O. Yu. (2017). The effect of growth regulators on the regenerative capacity of explants of Quercus Robur L. plants *in vitro*. *Bioresources and nature management*, *9*(3-4), 13–19. [In Ukrainian].
8. Domingues, D., Takahashi, H., Camara, C., & Nixdorf, S. (2012). Automated system developed to control pH and concentration of nutrient solution evaluated in hydroponic lettuce production. *Computers and Electronics in Agriculture*, *84*, 53–61
9. Feng, J., Zhi-yi, Z., Jun, Z., Na, Y., & Dmei, W. (2007). Contamination and browning in tissue culture of *Platanus occidentalis* L. *Forestry Studies in China*, *9*(4), 279–282. https://doi.org/10.1007/s11632-007-0044-9
10. Goenka, A. (2018). Hydroponics v/s Geoponics. *International Journal of Emerging Research and Development*, 1(5), 12–34. URL: https://www.ijariit.com/manuscripts/v4i4/V4I4-1562.pdf
11. Guri, A. Z., & Patel, K. N. (1998). Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. U.S. Patent 5750402 A. URL: http:/www.ppm4plant-tc.com (accessed August 20, 2016).
12. Hand, C., Wada, N., Stockwell, V., & Reed, B. (2016). Node position influences viability and contamination in hazelnut shoot explants. *In vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant. https://doi.org/10.1007/s11627-016-9791-4
13. Huh, Y. S., Lee, J. K., & Nam, S. Y. (2017). Effect of plant growth regulators and antioxidants on *in vitro* plant regeneration and callus induction from leaf explants of purple passion fruit (Passiflora edulis Sims). *Journal of Plant Biotechnology*, 44(3), 335–342. https://doi.org/10.5010/JPB.2017.44.3.335
14. Kefeli, V. I., & Kalevitch, M. V. (2003). Natural growth inhibitors and phytohormones in plant and environment. *Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers*, 96–105. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0315-4
15. Khudoleeva, L. V., Kutsokon, N. K., & Nesterenko, O. G. (2017). *In vitro* cultivation of poplar and willow clones promising for renewable energy. *Biological systems*, 9(1), 18–22. [In Ukrainian].
16. Ko, W., Su, C., Chen, C., & Chao, C. (2009). Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(2), 137–141. https://doi.org/10.1007/s11240-008-9469-7
17. Kolchanova, O. V., & Obozny, O. I. (2015). Peculiarities of introduction into *in vitro* culture of representatives of the genus

Corylus. *Bulletin of the KHNAU named after V. V. Dokuchaeva*. Series: Biology, 3(36), 91–97. [In Ukrainian].
18. Kosenko, I. S., Boyko, A. L., Opalko, A. I., Nebykov, M. V., & Tarasenko, G. A. (2009). Micropropagation of *Corylus colurna* L. Acta Horticulturae, 845, 261–266. URL: https://www.actahort.org/books/845/845_37.htm
19. Kosenko, I. S., Opalko, A. I., & Nebykov, M. V. (2008). Regeneration of plants in the process of microclonal reproduction. Autochthonous and introduced plants. *Collection of scientific works of the National People's Party "Sophiivka" of the National Academy of Sciences of Ukraine*, Vol. 3-4, 57–67. [In Ukrainian].
20. Kovalchuk, N. V., Melnykova, N. M., & Musatenko, L. I. (2012). Role of phytolectin in the life cycle of plants. *Biopolymers and Cell*, 28 (3), 171–180. https://doi.org/10.7124/bc.00004A
21. Kraj, W., & Dolnicki, A. (2003). The influence of PPM upon the sterility of the *in vitro* cultures in European beech (*Fagus silvatica* L.). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 72(4), 303–307.
22. Krishna, H., Sairam, R., Singh, S., Patel, V., et al. (2008). Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Scientia Horticulturae*, 118(2), 132–138. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.040
23. Krishna, Kumari B., Chandrica, C., & Haripriya, B. (2021). Comparative study on hydroponics and geoponics. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 8(4), 305–312.
24. Kumar, Shukla P., Mishra, P., & Mishra, N. (2019). A prospective study on emerging roles of phytoalexins in plant protection. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 10(3), 186–198. https://doi.org/10.22376/ijpbs.2019.10.3.b186-198
25. Kushnir, G. P., & Sarnatska, V. V. (2005). Microclonal propagation of plants. Theory and practice. Kyiv: Scientific opinion, 235 p. [In Ukrainian].
26. Kyrychenko, O. V. (2011). Biological activity of exogenous plant lectins in the formation and functioning of phytobacterial associations. *Bulletin of the KHNAU named after V. V. Dokuchaeva. Series: Biology*, 2(23), 46–59. URL: https://repo.btu.kharkov.ua//handle/123456789/8484
27. Kyrychenko, O. V. (2014). Phytolectins and diazotrophs are multifunctional components of complex biological compositions. Biotechnologia acta, 7(1), 40–53. [In Ukrainian].
28. Kyrychenko, O. V., & Sergienko, V. G. (2006). Fungitoxic activity of plant lectins. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*, 38(6), 526–534. [In Ukrainian].
29. Leng, P., Su S., Wei F., et al. (2009). Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and antioxidation enzymes during pistachio tissue culture. *Acta horticulturae*, 829, 127–132. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.829.17
30. Lisovyi, M. M. (2023). The influence of sterilant substances on the decontamination of explants of *Thuja occidentalis* L. in *in vitro* culture. *Scientific Bulletin of UNFU*, 33(1), 34–38. https://doi.org/10.36930/40330105
31. Lysak, Yu. S. (2017). Ways of preserving genetic material and problems of micropropagation of Bolleana poplar (*Populus Bolleana Lauche*) in *in vitro* culture. *Materials of the XIII International Scientific Conference of Young Scientists*, Lviv, October 11-13, 45–47. [In Ukrainian].
32. Lysak, Yu. S. (2023). Features of the technology of clonal reproduction of hazelnuts by grafting *in vitro* and ways to increase its efficiency. *Scientific Bulletin of UNFU*, 33(6), 33–47. https://doi.org/10.36930/40330605
33. Matskevich, V. V., Kimeychuk, I. V., Matskevich, O. V., & Shita, O. P. (2022). World experience, prospects of hazelnut and almond breeding in Ukraine. Agrobiology, 1, 179–191. https://doi.org/10.33245/2310-9270-2022-171-1-179-191
34. North, J., Ndakidemi, P., & Laubscher, C. (2012). Effects of antioxidants, plant growth regulators and wounding on phenolic compound excretion during micropropagation of *Strelitzia reginae*. *International Journal of Physical Sciences*, 7(4), 638–646.
35. Okemwa, E. (2015). Effectiveness of aquaponic and hydroponic gardening to traditional gardening. *International Journal of Scientific Research and Innovative Technology*, 2, 2313–3759.
36. Ongenaa, M., Daayfb, F., Jacquesa, P., Thonarta, P., Benhamoud, N., Paulitze, T. C., & Bealangerc, R. R. (2000). Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. *Plant Pathology*, 49, 523–530.
37. Pincelli-Souza, R., Moreira, L., & Cohen, J. (2022). Improvements for the Micropropagation of Hybrid Hazelnut (*C. americana* × *C. avellana*). *Horticulturae*, 8(9), 849. https://doi.org/10.3390/horticulturae8090849
38. Pincelli-Souza, R., Tillmann, M., Esler, M., Alves, C., & Cohen, J. (2018). Hybrid hazelnut: micropropagation, rooting and acclimatization. *Acta Horticulturae*, 1191, 113–120. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1191.16
39. Polishchuk, V. V., Turchyna, S. Ya., & Osipov, M. Yu. (2019). Selection of a sterilizer for the introduction of *in vitro* donor material of the studied varieties of Callistephus Chinensis (L.) Ness. for the purpose of further use in landscaping. *Scientific Bulletin of UNFU*, 29(5), 22–26. https://doi.org/10.15421/40290504
40. Reed, B. M., Mentzer, J., Tanprasert, P., & Yu, X. (1997). Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: Identification and antibiotic treatment. *Developments in Plant Pathology*, 12, 169–174.
41. Ryzhenko, T. S. (2021). Optimizing the sterilization regime of explants of Juglans regia L. Forestry and agroforestry improvement, 139, 35–4. https://doi.org/10.33220/1026-3365.139.2021.35
42. Sergienko, N. V. (2011). Specificity of shoot formation *in vitro* in representatives of the genus *Corylus* L. *Autochthonous and introduced plants*, 7, 110–114. [In Ukrainian].
43. Silvestri, C., Rugini, E., & Cristofori, V. (2019). The effect of CuSO4 for establishing *in vitro* culture, and the role nitrogen and iron sources in *in vitro* multiplication of *Corylus avellana* L. cv. Tonda Gentile Romana. Plant biosystems – An international journal dealing with all aspects of plant biology. https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1549610
44. Tewelde, S., Patharajan, S., Teka, Z., & Sbhatu, D. B. (2020). Assessing the efficacy of broad-spectrum antibiotics in controlling bacterial contamination in the *in vitro* micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc). *Hindawi The Scientific World Journal*, 1–8. https://doi.org/10.1155/2020/6431301

Yu. S. Lysak

Ukrainian Order "Sign of Honour" Research Institute of Forestry and Forest Melioration named after G. M. Vysotsky, Kharkiv, Ukraine

WAYS OF INCREASING THE EFFICIENCY OF THE PROCESS OF DECONTAMINATION OF PRIMARY HAZELNUT EXPLANTS DURING CLONAL PROPAGATION *IN VITRO*

A study was conducted to increase the efficiency of the method of clonal propagation of the hazelnut varieties 'Veleten' and 'Kharkiv-4' by cuttings due to the improvement of the material decontamination process. The method of growing mother plants on prepared soil in a closed environment with control of nutrition and environmental parameters was used to obtain donor material with a higher degree of microbiological purity. The effectiveness of the use of antiseptic drugs such as "Miramistin", "Gorosten", "Dequadin", and the disinfectant "Lisoformin 3000" in the process of microbial decontamination of hazelnut explants was investigated. The effectiveness of the combination of primary surface sterilization of explants with the use of sterilants at the first and second stages of processing, in particular, hydrogen peroxide, ethanol, sodium hypochlorite and subsequent decontamination using antiseptic prepara-

tions and a disinfectant at the third stage was studied. The following results were obtained: the lowest rates of contamination with saprophytic micromycetes were observed when primary sterilization was combined with the use of 0.5 % of the "Lisoformin 3000" solution: 7.57-12.01 % of contaminated plants were obtained for a duration of exposure of 5 min, and 10.04-12.0 % for exposure duration of 10 min. The use of the drug "Miramistin" in combination with primary surface sterilization enabled obtaining contamination rates at the level of 22.85-32.14 % and 28.28-32.80 % for 5 and 10 minutes of exposure to the drug, respectively. The use of the drugs "Gorosten" and "Dequadin", even after primary sterilization, was ineffective; the drugs did not demonstrate fungicidal or fungistatic effect – 75.57-95.76 % of contaminated explants. The effectiveness of the use of "Lisoformin 3000" in the process of two-stage treatment of hazelnut explants was investigated, primary sterilization using hydrogen peroxide and ethanol in the first stage and subsequent decontamination using a 0.25 % solution of "Lisoformin 3000" for a duration of exposure of 15 minutes. As a result, the contamination rates were reduced, compared to the control – 33.72 and 39.23 %%. Moreover, research was conducted on the neutralization of mycelium and spores in samples with signs of infection with saprophytic micromycetes using 0.5 and 1.0 %% solutions of "Lisoformin 3000". On the 15th day of cultivation after the processing procedure, 45.22-51.0 % of explants without signs of infection were obtained.

Keywords: aseptic culture of cuttings; microbial contamination; antiseptic drugs; disinfectant; sterilization; saprophytic micromycetes.