

ПІДБІР ОПТИМАЛЬНОГО РЕГЛАМЕНТУ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ЕКСПЛАНТІВ ЕРЕКТОЇДНИХ ФОРМ КУКУРУДЗИ

Ю. В. БІЛОКУР, аспірант

Л. О. РЯБОВОЛ, доктор сільськогосподарських наук

Я. С. РЯБОВОЛ, доктор сільськогосподарських наук,=

Уманський національний університет садівництва

*Підібрано оптимальну схему стерилізації експлантів еректоїдних форм кукурудзи при введенні в культуру *in vitro*. Досліджено вплив умов проведення стерилізації на патогенну мікрофлору та життєздатність експлантів кукурудзи. Встановлено особливості застосування низки стерилізаторів і підібрано оптимальні режими для ефективної стерилізації проростків форм кукурудзи з еректоїдним розміщенням листків.*

Ключові слова: кукурудза, *in vitro*, експлант, регламент стерилізації, стерилізатори, концентрація, експозиція.

У селекційній практиці нині частіше використовують біотехнологічні методи. Прискорене розмноження дефіцитних генотипів *in vitro* за мікроклонування дає змогу отримати і зберегти генетично ідентичні матеріали [1]. Застосування культури *in vitro* дає змогу моделювати силу тиску стресового агента на організм, тотально дослідити його вплив на біооб'єкт, контролювати фізичні та хімічні показники вирощування рослинного матеріалу, проводити роботу незалежно від погодних умов і пори року [2].

Стерилізація рослинного матеріалу належить до найважливіших етапів технології розмноження *in vitro*. На поверхні вегетуючої рослини знаходиться значна кількість різноманітних мікроорганізмів, що здатні розмножуватись на живильному середовищі. У процесі розвитку грибкові та бактеріальні інфекції не тільки поглинають поживні речовини штучного живильного субстрату, а й гальмують ростові процеси у клітинах експланту та всіх біологічних процесів рослин. Тобто, від якості стерилізації залежить успіх подальшого культивування [3, 4].

Для кукурудзи інформацію з цього питання в літературі викладено недостатньо, що і спонукало до проведення досліджень. Було поставлено завдання з'ясувати особливості застосування загальноживаних і нових стерилізаторів і підібрати оптимальні режими для ефективної стерилізації проростків кукурудзи.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Культура *in vitro* дає можливість повністю контролювати умови вирощування біоматеріалу,

досліджувати вплив чинників на розвиток організмів, проводити маніпуляції з об'єктами на клітинному рівні.

Використання селекційно перспективних генотипів кукурудзи у біотехнологічних розробках широко поширено за кордоном. Найчастіше дослідження проводять з добре вивченими, модельними генотипами, що мають високий біотехнологічний потенціал, не зважаючи на господарські показники. У той же час у роботі з клітинної і генетичної інженерії з практичного погляду необхідно використовувати генотипи з цінними селекційними ознаками. Отже, дослідження біотехнологічного потенціалу, зокрема, молекулярно-генетичних характеристик, клітинно- й генетично-інженерних особливостей селекційно перспективних типів зародкової плазми кукурудзи є актуальним завданням біотехнологічної ланки селекційного процесу та одним із способів підвищення його ефективності [5, 6].

Залучення біотехнологічних методів у селекційну схему підвищує ефективність добору та прискорює створення нових форм рослин з бажаними ознаками і властивостями. Першим етапом з проведення біотехнологічних досліджень є підбір умов стерилізації та введення рослинних експлантів у культуру *in vitro* [1, 3, 7, 8].

У процесі стерилізації необхідно звільнити поверхню рослинного матеріалу від мікроорганізмів, щоб мінімізувати небезпеку пошкодження експлантів стерилізатором, до складу кожного з яких входять токсичні речовини [4, 5, 9].

Для стерилізації рослинних об'єктів використовують різноманітні хімічні речовини: сполуки на основі хлору, ртуті, феноли, органічні та мінеральні кислоти, перекис водню, перманганат калію, спирт тощо. Ефективність створення асептичної культури *in vitro* залежить від низки чинників, зокрема, видових особливостей, типу експланту та його фізіологічного стану, стерилізувального агента, його концентрації, режиму стерилізації. За підбору оптимальної схеми проведення стерилізації вихід асептичного матеріалу, що зберігає життєздатність в умовах *in vitro* у різних біовидів становить 68–95 % [4, 5, 8, 9]. Зазвичай для стерилізації різних тканин і органів рослин застосовують сулему і етанол, зокрема і для експлантів кукурудзи. Відомо, що для стерилізації низки культур можна використовувати 0,1 %-вий водний розчин сулеми за експозиції 1–20 хв [10, 11].

Метою досліджень була розробити регламент стерилізації апікальної меристеми проростків кукурудзи за введення матеріалу в культуру *in vitro*.

Методика досліджень. Дослідження проводили упродовж 2019–2020 років у навчально-науково-виробничій лабораторії біотехнології Уманського НУС.

За експланти використовували проростки низки ліній та гібридів кукурудзи. Очищений і промитий рослинний матеріал на 1–2 хв поміщали у стаканчики з 70 %-им етиловим спиртом, а потім переносили в основний стерилізуючий розчин. Після стерилізації матеріал відмивали 5–8 раз у стерильній дистильованій воді.

Попередню стерилізацію проводили обробкою експлантів мильним розчином упродовж 30 хв і наступним промиванням проточною водою. Для основної стерилізації використовували низку хімічних сполук, зокрема, етанол (C₂H₅OH), гіпохлорид натрію (комерційна назва «Білизна»), пероксид водню (H₂O₂), перманганат калію (KMnO₄) за різної експозиції та концентрації стерилізуючого робочого розчину.

Результати досліджень. Встановлено, що при стерилізації експлантів кукурудзи за експозиції 10 хв етанолом і гіпохлоридом натрію концентрацією робочого розчину 5 % і 10 %, отримано відносно однакову кількість життєздатних експлантів — відповідно 10,8–12,8 %. Відмічено, що за стерилізації рослинного матеріалу етанолом за експозиції 20 хв кількість життєздатного матеріалу отримано на рівні 10,4 % за найвищого некрозу експлантів (84,3 %).

Табл. Ефективність стерилізації рослинного матеріалу кукурудзи залежно від типу стерилізатора та експозиції

Стерилізатор	Концентрація стерилізатора, %	Експозиція стерилізації, хв.	Кількість стерильного життєздатного матеріалу, %	Кількість інфікованого матеріалу, %	Некроз експланту, %
Етанол	70	10	11,5	13,7	74,8
		15	11,2	6,4	82,4
		20	10,4	5,3	84,3
Гіпохлорид натрію	5	10	10,8	26,8	62,4
		15	12,6	21,2	66,2
		20	13,8	18,3	67,9
	10	10	12,8	20,5	66,7
		15	26,7	13,4	59,9
		20	49,5	9,8	40,7
	15	10	56,2	5,8	38,0
		15	73,6	2,5	23,9
		20	54,8	4,9	40,3
Пероксид водню	3	10	62,9	8,7	28,4
		15	60,4	7,0	32,6
		20	58,9	4,9	36,2
Перманганат калію	0,5	10	78,2	11,3	10,5
		15	68,4	8,4	23,2
		20	64,3	4,3	31,4
	0,1	10	85,7	1,8	12,5
		15	65,3	1,3	33,4
		20	47,6	0,6	51,8
<i>НІР₀₁</i>		—	2,3	1,7	5,9

Гіпохлорид натрію характеризується високим токсичним впливом на живі організми, що у високих концентраціях викликає істотну частку некрозу експлантів. Найкращі результати досягнуто за використання цього стерилізатора концентрацією 15 % за експозиції 15 хв. У цьому варіанті досліду життєздатного матеріалу отримано на рівні 73,6 %, а некроз спостерігали у 23,9 % рослин.

Тривалість обробки проростків кукурудзи пероксидом водню з 3 %-ю концентрацією не впливала на ефективність стерилізації. Зі збільшенням експозиції стерилізації спостерігалось незначне зменшення кількості життєздатного стерильного матеріалу у діапазоні 62,9–58,9 %, а некроз експлантів — 28,4–36,2 %.

Найефективнішою стерилізуючою речовиною для введення проростків в ізолювану культуру визначено 0,1 %-ву концентрацію перманганат калію за експозиції 10 хв. Вихід стерильних життєздатних експлантів у цьому варіанті досліду склав 85,7 %. Зі збільшенням експозиції стерилізації до 15 і 20 хв вихід стерильних експлантів істотно зменшувався і становив відповідно 65,3 і 47,6 %. Відмічено, що за використання перманганату калію кількість інфікованого матеріалу була найнижчою в досліді й варіювала в межах 0,6–1,8 %. Нижчі результати було зафіксовано за стерилізації перманганатом калію 0,5 %-ю концентрацією та встановлено, що за експозиції 10 хв, вихід стерильних життєздатних експлантів становив 78,2 %, а за збільшення експозиції до 20 хв — 64,3 %.

Некроз експланту виявлено в усіх варіантах досліду, однак найбільшу кількість загиблих живців отримано за стерилізації етанолом концентрацією 70 % і експозиції 20 хв.

Висновки. Стерилізуючі речовини характеризуються індивідуальним впливом на патогенну мікрофлору і тканини експлантів кукурудзи. Доведено, що найефективнішим стерилізатором для проростків кукурудзи з еректоїдним розміщенням листків є 0,1 %-й розчин перманганату калію за експозиції 10 хв. Вихід стерильних життєздатних експлантів у цьому варіанті досліду складає 85,7 %.

Література

1. Деркач К. В., Борисова В. В., Маленький В. О. Здатність до калусогенезу *in vitro* у ліній кукурудзи плазми Ланкастер за варіювання умов довкілля. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. Т. 22. С. 228–234.
2. Любченко І. О., Рябовол Л. О., Любченко А. І. Використання культури *in vitro* в адаптивній селекції рослин (огляд літератури). *Збірник наукових праць Уманського НУС*. Умань, 2016. Вип. 88. С. 126–136.
3. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин: Навч. посіб. Київ: ПоліграфКонсалтинг, 2003. 520 с.
4. Поліщук В. В., Рябовол Л. О., Чучмій І. П. Калусотвірна і регенераційна здатність сортів, гібридів та інбредних ліній кукурудзи. *Збірник наукових праць Уманської ДДА*. 2000. Вип. 52. С. 36–39.

5. Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Морфогенез *in vitro* у ліній кукурудзи гетерозисної групи Ланкастер. *Цитологія і генетика*. 2017. Т. 51. № 1. С. 61–68.
6. Деркач К. В. Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер: дис. канд. біол. наук: 03.00.20. Дніпро, 2018. 316 с.
7. Бугайов В. Д., Васильківський С. П., Власенко В. А. та ін. *Спеціальна селекція польових культур*: навч. посіб. Біла Церква, 2010. 368 с.
8. Поліщук В. В., Ковальчук І. В., Адаменко Д. М. Удосконалення методів мікроклонального розмноження кукурудзи. *Збірник наукових праць Уманського НУС*. Умань, 2011. Вип. 75. С. 139–149.
9. Kutas E. The influence of sterilizing compounds on the yield of viable explants of *Rhododendron* L. (Ericaceae). *International journal of biodiversity and conservation*. 2011. Vol. 3, №1. P. 24–26.
10. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Київ: Наукова думка, 1980. 488 с.
11. Клейн Р. М., Клейн Д. Т. Методы исследования растений: Пер. с англ. / Ред. В. И. Мельгунова. Москва : Колос, 1974. 528 с.

References

1. Derkach, K. V., Borysova, V. V., Malenkyi, V. O. (2018). The ability to callusogenesis *in vitro* in Lancaster plasma maize lines with varying environmental conditions. *Factors of experimental evolution of organisms*, no. 22, pp. 228–234. (in Ukrainian).
2. Liubchenko, I. O., Riabovol, L. O., Liubchenko, A. I. (2016). The use of *in vitro* culture in adaptive plant breeding (literature review). *Collection of scientific works of Uman NUS*, no. 88, pp. 126–136. (in Ukrainian).
3. Melnychuk, M. D., Novak, T. V., Kunakh, V. A. (2003). *Plant biotechnology*. Kiev. 520 p. (in Ukrainian).
4. Polishchuk, V. V., Riabovol, L. O., Chuchmii, I. P. (2000). Callus-forming and regenerative ability of varieties, hybrids and inbred lines of corn. Kyiv: *Knowledge of Ukraine*, vol. 52, pp. 36–39. (in Ukrainian).
5. Derkach, K. V., Abramova, O. Ye., Satarova, T. M. (2017). In vitro morphogenesis in corn lines of the Lancaster heterosis group. *Cytology and genetics*, vol 51, no. 1. pp. 61–68. (in Ukrainian).
6. Derkach, K. V. (2018). Biotechnological characteristics of genotypes of corn germplasm Lancaster. *Dis. Cand. biol. Science*. Dnipro 316 p. (in Ukrainian).
7. Buhaiov, V. D., Vasylykivskyi, S. P., Vlasenko, V. A. and other. (2010). *Special selection of field crops*. edited by M. Ya. Molotskoho. Bila Tserkva. 368 p. (in Ukrainian).
8. Polishchuk, V. V., Kovalchuk, I. V., Adamenko, D. M. (2011). Improvement of methods of microclonal propagation of corn. *Collection of scientific works*, vol. 75, pp. 139–149. (in Ukrainian).

9. Kutas, E. (2011). The influence of sterilizing compounds on the yield of viable explants of *Rhododendron* L. (Ericaceae). *International journal of biodiversity and conservation*, vol. 3, no.1. pp. 24–26. (in English).

10. Kalynyn, F. L., Sarnatskaia, V. V., Polyshchuk, V. E. (1980). *Tissue culture methods in plant physiology and biochemistry*. Kiev: Scientific opinion. 488 p. (in Russian).

11. Klein, R. M., Klein, D. T. (1974). *Methods of plant research*. Ed. V. I. Melgunov. Moscow: Kolos. 528 p. (in Russian).

Аннотация

Белокур Ю. В., Рябовол Л. О., Рябовол Я. С.

Подбор оптимального регламента стерилизации эксплантов эректоидных форм кукурузы

В статье изложены результаты исследований по оптимизации техники стерилизации проростков исходных форм гетерозисных гибридов кукурузы при введении *in vitro*. Выяснено, что стерилизация растительного материала относится к важнейшим этапам технологии размножения *in vitro*. На поверхности растения находится значительное количество разнообразных микроорганизмов, способных размножаться на питательной среде.

Целью исследований была разработка регламента стерилизации апикальной меристемы проростков кукурузы при введении материала в культуру *in vitro*. Для решения цели была поставлена задача выяснения особенностей применения общеупотребительных и новых стерилизаторов и подбора оптимальных режимов для эффективной стерилизации проростков кукурузы.

Эксплантами использовали проростки ряда линий и гибридов кукурузы. Очищенный и промытый растительный материал на 1–2 мин помещали в стаканчики с 70 %-ным этиловым спиртом, а затем переносили в основной раствор для стерилизации. После стерилизации материал отмывали 5–8 раз в стерильной дистиллированной воде.

Исследованиями установлено особенности применения ряда стерилизаторов и подобраны оптимальные режимы для эффективной стерилизации проростков форм кукурузы с эректоидным размещением листьев. Подобраны стерилизаторы для проведения эффективной стерилизации эксплантов. Установлено, что гипохлорит натрия характеризуется высоким токсическим воздействием на живые организмы, в высоких концентрациях вызывает существенное количество некроза эксплантов, а продолжительность обработки проростков кукурузы перекисью водорода 3 %-ной концентрации не влияла на эффективность стерилизации.

Установлено, эффективным стерилизующим веществом для ввода проростков в изолированную культуру определено 0,1 %-ий раствор перманганата калия при экспозиции 10 мин., который даёт возможность получить до 86 % жизнеспособных проростков культуры.

При увеличении экспозиции стерилизации до 15 и 20 минут выход стерильных эксплантов существенно уменьшался и составил до 65 и 48 %, соответственно. Отмечено, что при использовании перманганата калия количество инфицированного материала была самой низкой за опытом и варьировала в пределах 0,6–1,8 %.

Ключевые слова: кукуруза, *in vitro*, эксплант, регламент стерилизации, стерилизаторы, концентрация, экспозиция.

Annotation

Belokur Yu. V., Ryabovol L. O., Ryabovol Ya. S.

Selection of the optimal sterilization schedule for explants of erectoid forms of corn

The article presents the results of studies to optimize the sterilization technique for seedlings of the initial forms of heterotic hybrids of maize when administered in vitro. On the surface of the plant there is a significant number of various microorganisms that can multiply on a nutrient medium. Therefore, sterilization of plant material is one of the most important stages of in vitro propagation technology.

The aim of the research was to develop a procedure for sterilizing the apical meristem of maize seedlings when the material is introduced into isolation culture. To solve the problem, the task was to clarify the features of the use of common and new sterilizers and the selection of optimal modes for effective sterilization of seedlings.

Seedlings of a number of maize lines and hybrids were used as explants. The purified and washed plant material was placed in cups with 70 % ethyl alcohol for 1–2 min, and then transferred to the basic solution for sterilization. After sterilization, the material was washed 5–8 times in sterile distilled water.

Studies have established the features of the use of a number of sterilizers and selected the optimal modes for effective sterilization of seedlings of forms of corn with erectoid placement of leaves. It was found that sodium hypochlorite is characterized by a high toxic effect on living organisms, in high concentrations causes a significant amount of explant necrosis. The duration of treatment of corn seedlings with hydrogen peroxide of 3 % concentration did not affect the sterilization efficiency.

The most effective sterilizing substance for the introduction of seedlings in an isolated culture was determined 0.1 % solution of potassium permanganate exposure of 10 minutes, which allows to obtain up to 86 % of viable seedlings. With an increase in the sterilization exposure to 15 and 20 minutes, the yield of sterile explants significantly decreased and amounted to 65 and 48 %, respectively. It was noted that when using potassium permanganate, the amount of infected material was the lowest in the experiment and varied within 0.6–1.8 %.

Key words: corn, *in vitro*, explant, sterilization regulations, sterilizers, concentration, exposure.