



# Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 634.7:581.1

© 2024

## ОСОБЛИВОСТІ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ОБЛІПИХИ КРУШИНОПОДІБНОЇ (*HIPPORHAE RHAMNOIDES*)

К.Є. Євпак<sup>1</sup>, М.О. Бублик<sup>2</sup>

<sup>2</sup>доктор сільськогосподарських наук, професор, академік НААН  
Інститут садівництва НААН, вул. Садова, 23, м. Київ, 03027, Україна  
e-mail: <sup>1</sup>katarinas063@gmail.com, <sup>2</sup>mbublyk@ukr.net  
ORCID: <sup>1</sup>0009-0004-7983-8881, <sup>2</sup>0000-0003-4056-791X

Надійшла 19.01.2024

**Мета.** Дослідити індивідуальні особливості отримання асептичної культури обліпики крушиноподібної (*Hipporhæ rhamnoides*). **Методи.** Лабораторний, математичний, розрахунково-порівняльний. **Результати.** Визначено оптимальні терміни введення в культуру *in vitro* експлантів обліпики. Підбрано умови, стерилізуючі агенти, поживне середовище для отримання асептичної культури обліпики. Досліди проводили на чотирьох сортах: Либідь, Київський Янтар, Моркв'яна, Адам. Як стерилізуючі агенти використовували гіпохлорит натрію, хлорид ртуті, Лізоформін за різного часу експозиції. Препарат Лізоформін був протестований у концентраціях 1,5%; 3; 5 та 10%. Живильними середовищами для проліферації слугували Murashige-Skoog (MS) та Woody Plant Medium (WPM), доповнені індолілмасляною кислотою (ІМК), нафтилоцтовою кислотою (НОК) та бензиламінопурином (БАП). **Висновки.** Для отримання асептичної культури обліпики доцільно використовувати експланти з пагонів, пророщених у січні – лютому. Найвищий відсоток стерильних експлантів був отриманий за обробки 0,1% HgCl<sub>2</sub> протягом 3,5 хв. У разі використання препарату Лізоформін у концентрації 10% протягом 3 хв морфогенна активність та стерильність експлантів були на достатньому рівні. Із живильних середовищ найоптимальнішим на етапі проліферації є WPM, доповнене ІМК 0,5 мг/л та БАП 0,5 мг/л.

**Ключові слова:** обліпіха, *in vitro*, введення в культуру, стерилізація, проліферація, експлант.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202402-08>

Обліпіха — культура, що має великий біологічний та екологічний потенціал. Популярність культури зумовлена її унікаль-

ним біохімічним складом і широкою екологічною пластичністю [1–3]. Культурний ареал обліпики поширився на країни

Європи, Східної та Південної Азії, Північної і Південної Америки [1, 3]. Рослину активно використовують у країнах Азії з метою рекультивації та фіторе mediaції, насамперед для захисту ділянок від вітрової ерозії та боротьби з опустелюванням [1]. У деяких європейських країнах плоди і листя обліпихи використовують у харчовій, фармацевтичній, косметичній промисловості [4].

Для отримання сортового садивного матеріалу застосовують різні методи розмноження, серед яких домінує зелене живцювання [3, 5, 6]. Але з розвитком селекції та зростанням попиту на чистий сортовий садивний матеріал постає питання прискорення процедури розмноження обліпихи, а також зберігання вихідних клонів рослин. У цьому контексті актуальним є розроблення методик мікроклонального розмноження обліпихи, альтернативних традиційним методикам.

Мікроклональне розмноження рослин здійснюється у кілька етапів, серед яких першим і досить важливим вважається отримання стерильної культури. Загальновідомо, що на успішність розмноження рослин в культурі *in vitro* впливають вік маточних рослин, якість експлантів, технологія знезараження, склад живильного середовища. Серед основних проблем, що виникають під час введення в культуру обліпихи, слід виокремити бактеріальну та грибку контамінацію й активне виділення у живильне середовище фенольних сполук [7].

**Мета досліджень** — поглиблене вивчення етапу ініціації мікроклонального розмноження обліпихи крушиноподібної (*Hippophae rhamnoides*), опрацювання даних, отриманих на етапі введення, що дасть змогу покращити і прискорити загальний процес розмноження обліпихи в культурі *in vitro*.

**Матеріали і методи досліджень.** Особливості отримання асептичної культури обліпихи досліджували на чотирьох сортах вітчизняної селекції: Либідь, Київський Янтар (комерційна селекція В.І. Дмитрієва), Морквяна (селекція Інституту садівництва НААН), жіночі форми та Адам, чоловіча форма. Досліди проводили впродовж 2020–2022 рр. у відділі вірусології, оздоровлення та розмноження плодівих і ягідних культур Інституту садівництва НААН.

Маточні рослини 5-річного віку відбирали за відповідними помологічними ознаками сорту. Для отримання експлантів пагони з маточних рослин вилучали в три терміни: січень–лютий, березень–травень, серпень. З метою знезараження їх обробляли розчином препарату Превікур Енерджі©Баєр. Пагони, відібрані в зимовий період, прощували в контрольованих умовах. Для цього їх поміщали у скляні ємності з дистильованою водою та розчином аскорбінової кислоти концентрації 50 мг/л. Бруньки, що розвинулись, видаляли з пагонів та стерилізували.

Безпосередньо перед стерилізацією експланти ретельно промивали у теплій проточній воді з миючим засобом, споліскували дистильованою водою. Така підготовка значно знижує контамінацію поверхневих тканин [8]. Також експланти протягом 10 хв обробляли розчином гіпохлориту натрію з додаванням поверхнево активної речовини Tween 20 [9].

Досліджували можливість використання як стерилізуючого агента двох препаратів: комерційного препарату Лізоформін у концентрації 1,5%; 3; 5 та 10% (містить у собі гліюксаль 7,5%, глутаровий альдегід 9,5% і дидецилдиметиламоній хлорид 9,6%) та 0,1% розчин хлориду ртуті. Додатково при стерилізації в умовах ламінарбоксу використовували 70% етанол (EtOH) з експозицією 10 с [8]. Також вивчали тривалість експозиції стерилізуючих агентів. Після проведення маніпуляцій експланти звільняли від лусочок та почорнілих листків.

На етапах введення в культуру та проліферації використовували середовища Murashige-Skoog (MS) [10], Woody Plant Medium (WPM) та їх модифікації. Показник рН середовища становив 6,2. Асептичні умови створювали із застосуванням методів, загальноприйнятих у біотехнології. Стерилізацію середовища проводили автоклавуванням при температурі 1200 °C і тиску 1 атм упродовж 20 хв. Культивування експлантів на живильному середовищі здійснювали за 16-годинного світлового дня з інтенсивністю освітлення 2000–2500 лк, температурою 20–22 °C і вологістю повітря 50–60%. У процесі культивування візуально аналізували морфогенез і регенераційну здатність. Інфіковані та некротизовані

експланти відбракували, а життєздатні — пересаджували на живильне середовище для розмноження.

**Результати досліджень.** Підбір оптимальної техніки стерилізації експлантів є запорукою успішної реалізації подальших етапів мікроклонального розмноження. Підбір реагентів для стерилізації та компонентів живильного середовища здійснювали за принципами не лише якісної дезінфекції, а й економічної доцільності. Дуже важливим на етапі введення є отримання стерильних і морфогенно активних експлантів.

Перший етап дослідження базувався на використанні одного стерилізуючого агента, а саме 0,1% хлориду ртуті з різною часовою експозицією, та на експлантах різного терміну відбору. Найвищий вихід життєздатних стерильних експлантів було отримано з пророщених бруньок обліпихи, відібраних у зимовий період. Для цього з маточних рослин у лютому нарізали однорічні пагони довжиною 15–20 см. Після обробки комерційним препаратом Превікур Енерджі їх пророщували протягом двох тижнів. Пророщені бруньки видаляли з пагонів, проводили їх стерилізацію.

Як стерилізуючий агент використовували 0,1%  $HgCl_2$ . Бруньки жіночих рослин після проходження процедури стерилізації мали вищі показники життєздатності порівняно з чоловічими. У працях [11, 12] також повідомляється, що жіночі квіткові бруньки

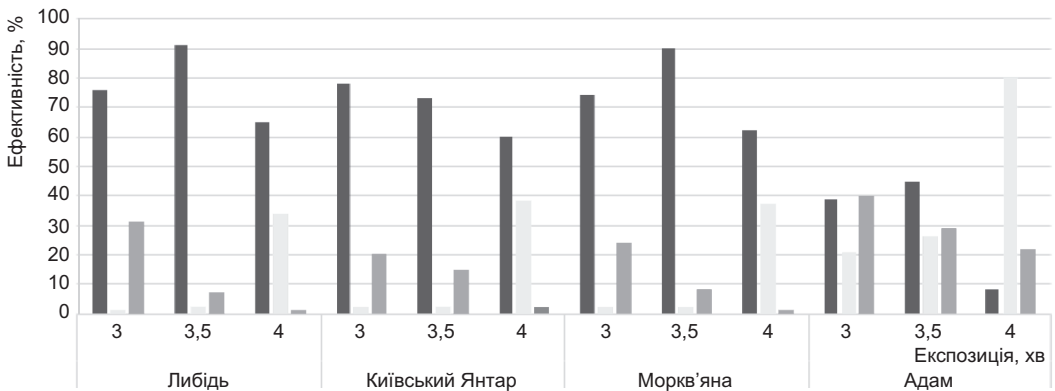
### 1. Вплив термінів введення в культуру *in vitro* на життєздатність експлантів

Час уведення	Кількість експлантів, %	
	життєздатних	інфікованих/ нежиттєздатних
Січень–лютий	90	10
Березень–травень	73	27
Серпень	21	79

тополі краще адаптуються до навколишнього середовища, а отже, краще переносять стресові умови порівняно з чоловічими.

Протягом весняного сезону, після виходу рослини зі стану спокою, в молодих бруньках активно синтезуються ауксини, що впливає на фізіологічний стан експлантів — відбувається стимулювання поділу клітин камбію, в результаті чого посилюється ріст, підвищується меристематична активність. Ступінь контамінації також певною мірою зумовлений термінами відбору експлантів (табл. 1), що підтверджують дані сучасних досліджень [13, 14].

На другому етапі дослідження, після пророщування пагонів та видалення експлантів, підбирали ефективні діючі речовини, їх оптимальні концентрації та тривалість експозиції. Основними діючими речовинами було обрано хлорид ртуті в концентрації 0,1% та комерційний препарат Лізоформін в концентраціях 1,5%; 3; 5 та 10%.



**Рис. 1. Ефективність використання 0,1%  $HgCl_2$  для стерилізації експлантів обліпихи**  
Експланти (тут і в табл. 2): ■ — життєздатні стерильні; ■ — стерильні нежиттєздатні; ■ — інфіковані

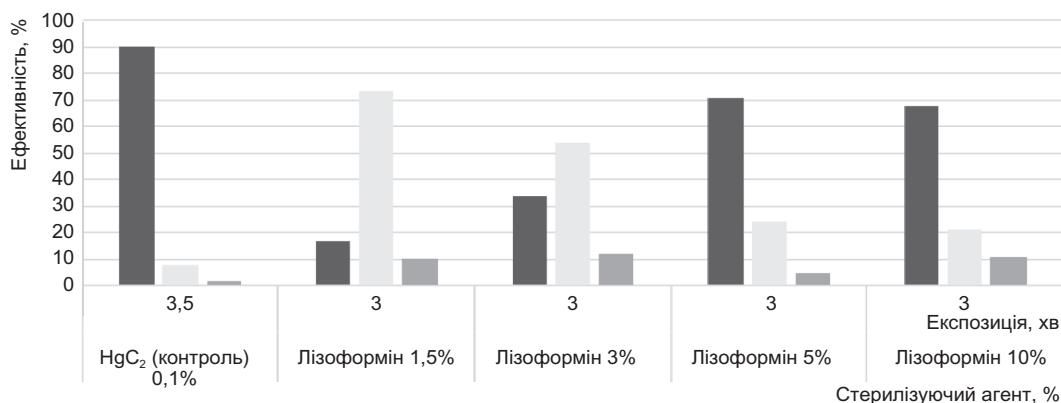


Рис. 2. Ефективність стерилізації експлантів сорту Либідь за використання Лізоформіну

Використовуючи 0,1% HgCl<sub>2</sub> як базовий стерилізуючий агент, отримали максимальні показники стерильних та морфогенно активних експлантів обліпихи сортів Либідь та Моркв'яна за експозиції 3,5 хв. Для сорту Київський Янтар кращим варіантом є експозиція 3 хв. Експланти чоловічої форми Адам мали слабкі показники приживлюваності, а тому потребують додаткового опрацювання (рис. 1).

Лізоформін як стерилізуючий засіб виявився менш ефективним — найвищий показник стерильних життєздатних експлантів за його використання становив 68% (рис. 2). На користь використання хлориду ртуті як стерилізуючого агента свідчить і низка іноземних джерел, зокрема [15]. Однак слід зазначити, що використання ртутних препаратів є шкідливим для здоров'я людини. Тому, зважаючи на позитивний стерилізуючий

## 2. Оцінка модифікацій живильних середовищ для ініціації культури обліпихи в умовах *in vitro*

Сорт	Базове середовище	Доповнення, мг/л	Кількість експлантів, що активно розвиваються, %	Приріст експлантів за 26 днів, см*
Либідь	WPM	Безгормональне	22	0,4±0,16
		ІМК 0,5 + БАП 0,5	73	2,1±0,16
		НОК 0,5 + БАП 0,5	61	1,1±0,19
	MS	Безгормональне	3	—
		ІМК 0,5 + БАП 0,5	53	0,9±0,14
		НОК 0,5 + БАП 0,5	41	0,4±0,15
Київський Янтар	WPM	Безгормональне	20	0,3±0,14
		ІМК 0,5 + БАП 0,5 л	69	1,9±0,21
		НОК 0,5 + БАП 0,5	54	0,9±0,18
	MS	Безгормональне	3	—
		ІМК 0,5 + БАП 0,5	50	0,8±0,14
		НОК 0,5 + БАП 0,5	39	0,5±0,11
Моркв'яна	WPM	Безгормональне	28	0,5±0,08
		ІМК 0,5 + БАП 0,5	77	2,3±0,17
		НОК 0,5 + БАП 0,5	62	1±0,11
	MS	Безгормональне	8	0,1±0,11
		ІМК 0,5 + БАП 0,5	50	1±0,11
		НОК 0,5 + БАП 0,5	44	0,6±0,13

Примітка. \* p<0,01.

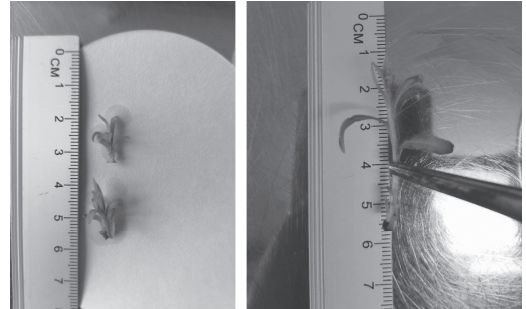
ефект препарату Лізоформін у концентрації 10% та його менш шкідливу дію на здоров'я людини, можна рекомендувати для використання і цей препарат.

Аналіз контамінантів проводили за допомогою світлової мікроскопії. Серед грибів, що розвинулися на живильному середовищі, зафіксовані *Cladosporium* sp. та *Penicillium* sp., які належать до цвільових грибів і є типовими для насаджень відкритих ділянок.

На останньому етапі дослідження підбирали середовище. З цією метою випробували MS і WPM, доповнені фітогормонами та вітамінами. На етапі ініціації найкращим варіантом для досліджуваних сортів є середовище WPM, доповнене БАП 0,5 мг/л та ІМК 0,5 мг/л. Після 26 днів культивування висота експлантів становила в середньому 2,1 см проти 0,9 см у разі використання середовища MS (табл. 2).

Рослини мали яскраво-зелене забарвлення, потужні пагони. Ознаки хлорозу та вітрифікації у них були відсутні (рис. 3). За використання середовища MS більшість експлантів протягом 26 днів пожовтіли, на них утворилися некротичні плями по краях листової пластини або були сформовані невеликі світлі пагони.

Важливим питанням під час введення в культуру експлантів обліпихи є виділення



**Рис. 3.** Розвиток експлантів обліпихи протягом 26 днів культивування на середовищі WPM: а — початок культивування; б — 26-й день культивування

фенольних сполук. Ці сполуки здатні призвести до пригнічення ростових процесів і, як наслідок, некрозів експлантів. Щоб попередити накопичення фенольних сполук у культуральному середовищі, автори праці [13] замочували експланти перед стерилізацією в розчині аскорбінової та лимонної кислот. Нами замочування не проводилось, але в складі живильного середовища на перших двох пасажах була збільшена концентрація аскорбінової кислоти. В подальшому інгібітори фенольних сполук не застосовували.

## Висновки

Встановлено, що для отримання асептичної культури обліпихи крушиноподібної доцільно використовувати експланти з пагонів, що були пророщені в зимовий період, із січня по лютий. Для підготовки вихідного матеріалу до введення у культуру слід застосовувати 70% розчин ЕтОН в експозиції 10 с та 0,1%  $\text{HgCl}_2$  протягом 3,5 хв. Застосування препарату Лізоформін було менш ефективним, а тому потребує подальшого вивчення.

Отримані під час дослідження результати свідчать про те, що в асептичних умовах бруньки жіночих рослин легше адаптуються порівняно з бруньками чоловічих рослин. Крім того, варто відзначити, що на етапі ініціації доцільно використовувати середовище WPM, доповнене ІМК 0,5 мг/л та БАП 0,5 мг/л. Загалом культивування в умовах *in vitro* потребує врахування індивідуальних особливостей усіх сортів культури.

Yeвпак К<sup>1</sup>., Bublyk M.<sup>2</sup>

Institute of Horticulture of NAAS, 23 Sadova Str., Kyiv, 03027, Ukraine; e-mail: <sup>1</sup>katarinas063@gmail.com, <sup>2</sup>mbublyk@ukr.net; ORCID: <sup>1</sup>0009-0004-7983-8881, <sup>2</sup>0000-0003-4056-791X

**Peculiarities of *in vitro* culture introduction of sea buckthorn (*Hippophae Rhamnoides*)**

**Goal.** To study the individual features of obtaining an aseptic culture of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). **Methods.** Laboratory, mathematical, computational and comparative. **Results.** The optimal terms for introducing sea buckthorn explants into *in vitro* culture were determined. The conditions, sterilizing agents, and nutrient medium for obtaining

an aseptic culture of sea buckthorn were selected. Experiments were conducted on four varieties: Lybid, Kyivskiy Yantar, Morkviana, Adam. As sterilizing agents, tritium hypochlorite, mercury chloride, and Lizoformin were used for different exposure times. The drug Lizoformin was tested in concentrations of 1.5%; 3; 5 and 10%. Murashige-Skoog (MS) and Woody Plant Medium (WPM) supplemented with indolylbutyric acid (IBA), naphthylacetic acid (NAA) and benzylaminopurine (BAP) served as growth media for proliferation. **Conclusions.** To obtain an aseptic culture of sea buckthorn, it is

advisable to use explants from shoots germinated in January–February. The highest percentage of sterile explants was obtained after treatment with 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 3.5 min. When using Lizoformin at a concentration of 10% for 3 minutes, the morphogenic activity and sterility of the explants were at a sufficient level. Among the nutrient media, the most optimal at the proliferation stage is the use of WPM supplemented with 0.5 mg/l IBA and 0.5 mg/l BAP.

**Key words:** sea buckthorn, *in vitro*, introduction into culture, sterilization, proliferation, explant.

**DOI:** <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202402-08>

## Бібліографія

1. International Seabuckthorn Association. The annual report of international seabuckthorn development for the year of 2020. Beijing: China WaterPower Press; 2021. Веб-сайт. URL: <https://fruittechcentre.eu/sites/default/files/files/pages/Annual%20Report%20of%20International%20Seabuckthorn%20Development%20in%202020.pdf> (дата звернення 21.12.2023).
2. Schacherer A. Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) — Potential for A New Crop Species in North America. University of Minnesota Digital Conservancy. 2023. P. 37.
3. Миколайко І.І., Шлапак В.П. *Hippophae rhamnoides* L. у філогенетичній системі рослинного світу. Науковий вісник НЛТУ України. 2014. Вип. 24. 1. С. 125–130.
4. Upadhyay N.K., Yogendra Kumar M.S., Gupta A. Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 2011. V. 48. N 12. P. 3443–3448. doi: 10.1016/j.fct.2010.09.019
5. Li T.S.C., Beveridge T.H.J. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): production and utilization. Ottawa: NRC Research Press, 2003. 140 p.
6. Гриник І.В., Москалець В.В., Москалець Т.З. та ін. Селекційно-технологічні основи вирощування обліпихи крушиноподібної в умовах Лісостепу й Полісся України. Новосілкі: Центр учбової літератури, 2020. С. 192.
7. Філіпова Л., Мацкевич В. Утворення регенерантами фенолподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від умов та виду рослин. *Вісник Львівського національного аграрного університету. Серія Агрономія*. 2013. Т. 17. № 2. С. 232–238.
8. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. Київ: Наукова думка, 2005. 270 с.
9. Запольський Я., Медведєва Т., Натальчук Т., Бублик М. Використання препарату Лізоформін 3000 для отримання асептичної культури жимолості в умовах *in vitro*. *Вісник аграрної науки*. 2018. № 9. С. 45–50. doi: 10.31073/agrovisnyk201809-07
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962. V.15. P. 473–497.
11. Song Y., Ma K., Ci D. et al. Biochemical, physiological and gene expression analysis reveals sex-specific differences in *Populus tomentosa* floral development. *Physiologia Plantarum*. 2014. V.150. N1. P. 18–31. doi: 10.1111/ppl.12078
12. Melnikova N.V., Borkhert E.V., Snezhkina A.V. et al. Sex-specific response to stress in *Populus*. *Frontiers in Plant Science*. 2017. N 8. P. 18–27. doi: 10.3389/fpls.2017.01827
13. Trivedi V.L., Nautiyal M.C., Sati J. et al. *In vitro* propagation of male and female *Hippophae salicifolia* D. Don. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2020. N 56. P. 98–110. doi: 10.1007/s11627-019-10020-8
14. Oribe Y., Funada R., Shibagaki M. et al. Cambial reactivation in locally heated stems of the evergreen conifer *Abies sachalinensis* (Schmidt) Masters. *Planta*. 2001. V. 212. P. 684–691. doi: 10.1007/s004250000430
15. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J. Plant Propagation by Tissue Culture: 3<sup>rd</sup> Edition. The Background. Dordrecht: Springer, 2008. 502 p. doi: 10.1007/978-1-4020-5005-3