




УДК 606:634.334:632.982.9

## Визначення ефективного способу стерилізації рослинних експлантів лайма *Citrus aurantifolia* та сортів лимона *Citrus lemon* для введення в культуру *in vitro*

Шох С.С. , Сич З.Д., Карпук Л.М. 

Білоцерківський національний аграрний університет

 Шох С.С. E-mail: shochss@ukr.net

Шох С.С., Сич З.Д., Карпук Л.М. Визначення ефективного способу стерилізації рослинних експлантів лайма *Citrus aurantifolia* та сортів лимона *Citrus lemon* для введення в культуру *in vitro*. Збірник наукових праць «Агробіологія», 2020. № 2. С. 185–191.

Shoh S.S., Sych Z.D., Karpuk L.M. Vyznachennja efektyvnoho sposobu sterylizacii' roslynnyh eksplantiv lajma *Citrus aurantifolia* ta sortiv lymona *Citrus lemon* dlja vvedennja v kul'turu *in vitro*. Zbirnyk naukovykh prac' «Agrobiologija», 2020. no. 2, pp. 185–191.

Рукопис отримано: 30.10.2020 р.

Прийнято: 13.10.2020 р.

Затверджено до друку: 24.11.2020 р.

doi: 10.33245/2310-9270-2020-161-2-185-191

Цитрусові рослини, які вирощують у горщику, користуються незмінним попитом, однак розмноження таких рослин потребує використання зимової теплиці та декількох добре розвинених маточних рослин для отримання садивного матеріалу. Використання мікроклонального розмноження дає змогу прискорити отримання насінневого матеріалу, однак вимагає детального розроблення методики культивування *in vitro*.

Метою досліджень було вивчення ефективності стерилізаційних речовин і способів стерилізації на вихід життєздатних мікропагонів рослин лайма (*Citrus aurantifolia*) та сортів лимона Мейєра та Ювілейний та їх ріст у культурі *in vitro*.

Дослідження проводили на базі міжкафедральної біотехнологічної лабораторії агробіотехнологічного факультету БНАУ. Вихідним матеріалом використовували мікропагони з рослин лайма (*Citrus aurantifolia*) та сортів лимона (*Citrus lemon*) Мейєра та Ювілейний. Об'єкти дослідження обрано за різномірністю генотипів, типом розвитку та сортовими особливостями. Особливістю культури *in vitro* є можливість використання для розмноження різних частин рослин. У дослідженнях використано мікропагони з брунькою.

Для знешкодження екзогенної бактеріальної та грибкової мікрофлори використовували 70 % розчин етанолу  $C_2H_5OH$ , гіпохлорит натрію 5 %, 15 % розчин пероксиду водню  $H_2O_2$ , сулеми (0,1) та відмивали в стерильній воді (один раз у 5–10 хв) за кількома схемами.

Установлено вплив різних режимів стерилізації для отримання стерильних експлантів та введення в культуру рослин експлантів виду лайма *Citrus aurantifolia* та сортів лимона Мейєра і Ювілейний. Виявлено, що використання ступеневої стерилізації з використанням 2,5 % розчину гіпохлориту натрію дає високий відсоток стерильного життєздатного матеріалу – 27,7 %, що суттєво більше за інші варіанти дослідів.

**Ключові слова:** мікропагони, лайм, стерильний матеріал, мікророзмноження, стерилізація, перексид водню, життєздатність експлантів.

**Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень.** Метод мікроклонального розмноження успішно використовують для швидкого розмноження цінних форм рослин. Такий метод дає змогу отримати максимальну кількість рослин, ідентичних вихідній, яку виділили за комплексом цінних ознак. Зазвичай для швидкого розмноження використовують частини рослин з точкою росту. Досягнення високих результатів у насінництві рослин можливо за допомогою мікророзмноження. Використовуючи умови

культивування *in vitro* коефіцієнт розмноження рослин зростає у кілька разів. Високі показники коефіцієнта розмноження з використанням методу мікроклонального розмноження отримано у багатьох культур: у цукрових буряків за шість місяців – 1:5000, що не може бути досягнуто використанням інших методів [5, 6].

Успіх мікророзмноження насамперед залежить від вдало підібраних методів стерилізації рослинного матеріалу. Стерильність – основна умова успішного розмноження рослин *in vitro*.

Ефективність практичного використання розмноженого матеріалу залежить також і від правильного підбору рослинного матеріалу для виділення експлантів. Особливу увагу слід приділяти відбору рослинного матеріалу вільного від інфекції, зокрема вірусної. Наявність вірусної інфекції свідчить про латентну форму інфекції, що ускладнює введення в культуру експлантів цитрусових культур. Відсутність зовнішньої – бактеріальної і грибної інфекції досягають підбором методів стерилізації та концентрацій стериліантів і експозиції обробки [7, 9].

Дослідження з мікроклонального розмноження рідкісних культур, які вирощують у кімнатних умовах, є новими для України. Цитрусові рослини, які вирощують у горщику, користуються незмінним попитом, однак розмноження таких рослин потребує використання зимової теплиці та декількох добре розвинених маточних рослин для отримання садивного матеріалу. Успішне розмноження цитрусових рослин, зокрема лайма (*Citrus aurantifolia*) та лимона (*Citrus lemon*) можливе із застосуванням клонального мікророзмноження, що дає змогу отримати велику кількість садивного матеріалу за короткий термін [3, 4].

Мікроклональне розмноження цитрусових культур стримує відсутність досліджень стерилізаційних речовин, ефективність їх концентрацій для отримання стерильної культури сортів лимона, та способів отримання стерильних мікропагонів для вирощування лайма (*Citrus aurantifolia*) в культурі *in vitro*.

**Метою дослідження** було вивчення ефективності стерилізаційних речовин і способів стерилізації на вихід життєздатних мікропагонів рослин лайма (*Citrus aurantifolia*) та сортів лимона Мейєра та Ювілейний та їх ріст у культурі *in vitro*.

**Матеріал і методи дослідження.** Дослідження проводили на базі міжкафедральної біотехнологічної лабораторії агробіотехнологічного факультету БНАУ. Вихідним матеріалом використовували мікропагони з рослин лайма (*Citrus aurantifolia*) та сортів лимона (*Citrus lemon*) Мейєра та Ювілейний. Об'єкти дослідження обрано за різномірністю генотипів, типом розвитку та сортовими особливостями. Особливістю культури *in vitro* є можливість використання для розмноження різних частин рослин. У дослідженнях використано пагони з брунькою, листком і черешком листка.

Сорт Мейєра або Китайський карлик. Карликова рослина з компактною, добре облищеною кроною. Один з найбільш низькорос-

лих сортів. Рослини сорту рано починають плодоносити. Квітки менші, ніж у інших сортів, білі, зібрані у суцвіття. Урожайний у кімнатній культурі, дає багато плодів з гладенькою і тонкою шкіркою. Плоди лимона масою до 100 г, округло-овальні, яскраво-жовті, іноді – оранжеві, шкірка легко відділяється.

Відрізняється підвищеною жаростійкістю та морозостійкістю, порівнюючи з іншими сортами лимона. Вирощують на південних і південно-західних вікнах.

Сорт Ювілейний. Дерево низькоросле, з розлогою кроною, до 1,5 м. Плоди крупні, достатньо кислі, округло-видовженої форми, товстошкірі, масою до 500 г. Рослини невибагливі до умов вирощування, жаростійкі та посухостійкі, легко переносять перепади температури до 5 °С.

Рослини швидко адаптуються до нових умов – 20–30 діб. Сорт слаборослий, часто замість пагонів формуються букетні гілочки з бутонами, які потрібно видаляти. Не вибагливий до родючості ґрунту, тіньовитривалий і посухостійкий.

Лайм – невелике дерево або кущ висотою від 1,5 до 5,0 м. Крона густа, гілки покриті короткими колючками. Суцвіття пазушні, з 1–5 квітками, цвітуть упродовж року, плоди невеликі – 4–6 см у діаметрі, яйцеподібні, м'якуш помаранчевий, кислий, має приємний духмяний аромат. Шкірка зелена, жовтувато-зелена, або жовта, за повної стиглості дуже тонка. Плодоносити починають з 3 року життя. Цвітіння і досягання плодів у рослин відбувається впродовж року. Збиральна стиглість – закінчення росту плоду та поява світло-зеленого забарвлення. Від лимона плоди відрізняються тоншою шкіркою та кислишим м'якушем.

Рослини для досліджень вирощували у горщиківій культурі в адаптаційній кімнаті біотехнологічної лабораторії, для наближення рослин до умов культивування *in vitro*. Відбір живців здійснювали у весняно-літній період за настання фази спокою (між 1 і 2 хвилиною росту рослин). Відбирали рослини здорові ззовні, без ознак хвороб та фізіологічних відхилень.

Експланти відбирали від рослин з високим потенціалом за комплексом сортових ознак. Для введення в культуру *in vitro* мікропагонів лимона та лайма відбирали верхівкові, добре розвинені пагони, які поміщали на зволожений фільтрувальний папір та складали у поліетиленові пакети з зіп-застібкою. Після підготування рослинного матеріалу важливо швидко вводити на середовище підготовлені

мікропагони, для запобігання подальшому інфікуванню рослинного матеріалу та, унаслідок, погіршенню росту рослин.

Враховуючи значну відмінність рослинного матеріалу цитрусових культур за генотипом та сортовими і видовими особливостями, підбирали кілька варіантів оброблення для кожного стериліянта.

Для знешкодження екзогенної бактеріальної та грибкової мікрофлори використовували 70 % розчин етанолу  $C_2H_5OH$ , гіпохлорит натрію 5 %, 15 % розчин пероксиду водню  $H_2O_2$ , сулеми (0,1) та відмивали в стерильній воді (один раз у 5–10 хв) за наступною схемою:

1. Етанол – 1 хв.
2. Гіпохлорид натрію – 10 хв.
3. Пероксид водню – 5 хв.
4. Сулема – 10 хв.

Після промивання стерилізовані мікропагони висаджували в пробірки та лабораторні банки з поживним середовищем Мурасіге і Скуга (MS) [10].

Стерилізацію мікропагонів обраних сортів здійснювали у ламінар-боксі за кількома схемами:

1. Гіпохлорит натрію 2,5 %, обробка впродовж 15 хв, промивання проточною водою 10 хвилин.
2. Гіпохлорит натрію 5 %, обробка впродовж 15 хв, промивання проточною водою 10 хвилин.

3. Гіпохлорит натрію 7 %, обробка впродовж 10 хв, промивання проточною водою 15 хвилин.

4. Пероксид водню 10 %, промивання проточною водою 5 хв.

5. Пероксид водню 15 %, промивання проточною водою 2,5 хв.

6. Пероксид водню 20 %, промивання проточною водою 2,5 хв.

Оброблений матеріал промивали стерильною дистильованою водою тричі по 10 хв.

Експланти культивували за освітлення 3–4 тис. лк, температурі  $23 \pm 2$  °C і вологості повітря 75 % з 14-годинним фотоперіодом. Результати експерименту оцінювали через 6–8 тижнів культивування.

**Результати дослідження та обговорення.** Окремі стерилізаційні речовини мали негативний вплив на мікропагони. У пробірках оброблені експланти часто гинули внаслідок негативного впливу на рослинні клітини лайма (*Citrus aurantifolia*) різних концентрацій стериліянту. За зменшення концентрацій стерилізаційних речовин вихід стерильної культури суттєво зменшувався. Застосування сулеми, незважаючи на високу ефективність стерилізації у варіанті досліду (15,9 %), призводило до знебарвлення тканин мікропагонів та надалі – зменшення відсотка життєздатних експлантів (рис. 1).

Варіант стерилізації з використанням етанолу також відрізнявся за своєю дією на экс-

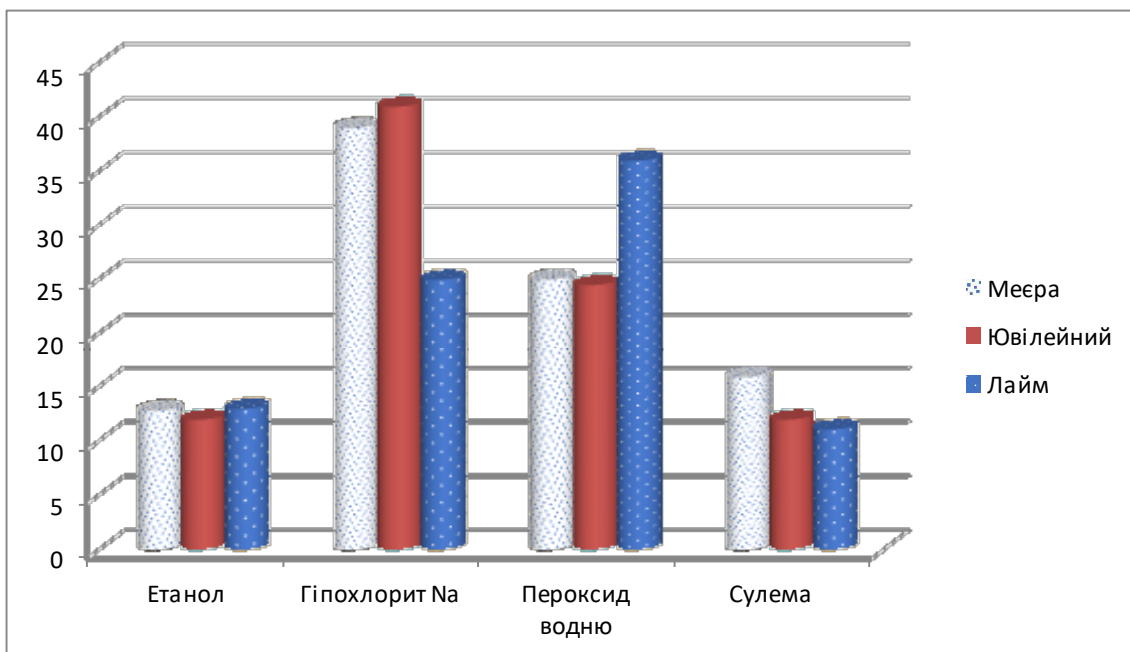


Рис. 1. Вплив стерилізуючих речовин на кількість життєздатних експлантів цитрусових культур.

планти. Незважаючи на високу ефективність, таке оброблення надалі негативно впливало на життєздатність мікропагонів під час культивування.

Серед досліджених зразків оброблення стерилізуючими речовинами негативно позначалось на життєздатності мікропагонів лайма. Варіант з обробленням пероксидом водню виявився найменш токсичним, що може бути пов'язано з морфологічною будовою кори рослин лайма.

Установлено, що за оброблення 70 % розчином етанолу (1 хв), пероксиду водню (5 хв) та сулеми (10 хв) отримано високий відсоток стерильних експлантів – 12,8–15,9 % (табл. 1). Оброблення гіпохлоритом натрію (10 хв) давало найменший відсоток стерильних пагонів (9,4 %), однак найбільшу кількість життєздатних експлантів сортів лимона Мейєра та Ювілейний.

ність оброблення та вихід життєздатних стерильних експлантів (15,7 і 14,8 % відповідно) (табл. 2).

Найбільшу ефективність у досліді відмічено у препараті гіпохлориту натрію за концентрації 2,5 % та експозиції 15 хвилин – вихід стерильних експлантів становить 27,7 %, що суттєво більше за інші варіанти досліді.

У дослідженні підібрали стерилізуючі речовини, які легко вимиваються з тканин рослин та мають мінімальний вплив на зменшення життєздатності експлантів. Для стерилізації мікропагонів лайма високу ефективність має варіант стерилізації пероксидом водню у концентрації 15 % та експозиції 5 хвилин. Під час аналізу різних концентрацій стерилізуючих речовин виявлено, що кількість життєздатних експлантів із сортів лимона була більшою у варіантів 1, 3, 5.

Таблиця 1 – Вихід життєздатних експлантів під час стерилізації пагонів цитрусових культур

Варіант	Стерилізаційні речовини	Концентрація, %	Час обробки, хв	Відсоток стерильних експлантів
1	Етанол	70	1	12,8 ± 1,4
2	Гіпохлорит Na	5	10	9,4 ± 3,9
3	Пероксид водню	15	5	13,2 ± 3,0
4	Сулема	0,1	10	15,9 ± 2,1

Таблиця 2 – Вихід життєздатних експлантів залежно від концентрації під час стерилізації мікропагонів сортів лимона Мейєра та Ювілейний

Варіант	Стерилізаційні речовини	Концентрація, %	Час обробки, хв	Відсоток стерильних експлантів
1	Гіпохлорит натрію	2,5	15	27,7 ± 4,0
2	Гіпохлорит натрію	5	15	1,4 ± 0,9
3	Гіпохлорит натрію	7	10	15,7 ± 2,0
4	Пероксид водню	10	5	4,8 ± 1,0
5	Пероксид водню	15	2,5	14,8 ± 3,1
6	Пероксид водню	20	2,5	5,2 ± 4,3

У наступному варіанті дослідження було проаналізовано різні концентрації стерилізуючих речовин – гіпохлориту натрію та пероксиду водню. Для визначення ефективної концентрації та експозиції стериліантів використовували додаткові концентрації стериліантів під час стерилізації мікропагонів. У варіантів 3 – гіпохлорит натрію (7 %, 10 хв) і 5 – пероксид водню (15 %, 2,5 хв) за збільшення концентрації збільшується ефектив-

Мікропагони з вегетативних бруньок дорослих рослин лайма характеризувалися низьким коефіцієнтом розмноження. Подальші дослідження, пов'язані з удосконаленням методики мікроклонального розмноження, потрібно спрямувати на вивчення режимів культивування мікропагонів та модифікації поживного середовища.

**Висновки.** Визначено кращу концентрацію стериліантів під час стерилізації мікропа-

гонів лайма. У варіанті пероксид водню 15 % і експозиції 5 хвилин відмічали найбільшу кількість життєздатних експлантів.

Найбільшу ефективність у досліді відмічено у препараті гіпохлорит натрію за концентрації 2,5 % та експозиції 15 хвилин – вихід стерильних експлантів становив 27,7 %, що суттєво більше за інші варіанти досліді.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Самарина Л.С., Коломиец Т.М. Особенности микроразмножения *C. limon* в условиях *in vitro*. Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: материалы IX молодежной научной конференции. Москва, 2009. ВНИИ СБ С. 25–26.

2. Горшков В.М., Самарина Л.С., Коломиец Т.М. Экологические и биологические особенности основных видов рода *Citrus* для промышленного возделывания. Субтропическое и южное садоводство России. 2009. Т. 2. С. 250–255.

3. Самарина Л.С., Коломиец Т.М. Регенерация лимона *in vitro* из стеблевых почек и нуцеллярных зародышей. Научное обеспечение АПК: сб. тез. IV науч.-практ. конф. молодых ученых. Краснодар, 2010. С. 220–222.

4. Самарина Л.С., Коломиец Т.М., Налбантова Н.С. Микроклональное размножение цитрусовых культур и их подвоев. Научное обеспечение АПК: сб. тез. VI науч.-практ. конф. молодых ученых. Краснодар, 2012. С. 51–53.

5. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин, теорія і практика. К.: Наук. думка, 2005. 270 с.

6. Подгасцький А.А., Мацкевич В.В., Подгасцький А.А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин: монографія. Біла Церква: БНАУ, 2018. 209 с.

7. Бутенко Р.Г. Биотехнологии на основе культивируемых *in vitro* клеток растений. Аграрная наука. 1993. № 4. С. 25–27.

8. Лейке Г., Лабес Р., Эргель К. Использование культуры тканей и органов в селекции растений и производстве посадочного материала. Петерсдорф. М.: Колос, 1980. 77 с.

9. Кунах В.А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К.: Логос, 2005. 730 с.

10. Murashige T., Skoog F. Arevised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Phys. Pia. 1962. 15, No 3. P. 473–497.

11. Биотехнологія рослин: навч. посіб. / Мельничук М.Д. та ін. К.: Видавничий центр НУБіП України, 2011. 216 с.

12. Murashige T. Plant propagation through tissue cultures. Annu. Rev. Plant Physiol. 1974. Vol. 25. P. 135–166.

13. Исследование эффективности антибиотиков и стерилизаторов нового поколения для подавления бактериальной и грибной контаминации среды и эксплантов / Л.Л. Бунцевич и др. Плодоводство и виноградарство Юга России. 2012. № 16.

14. Бунцевич Л.Л., Костюк М.А., Палецкая Е.Н. Совершенствование системы производства высококачественного безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур. Разработки, формирующие со-

временный облик садоводства: монография. Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ. 2011. С. 254–275.

15. Гранда Х.Р.К. Микроклональное размножение хризантем. Изв. ТСХА. 2009. № 1. С. 145–148.

16. Челябин Д.Н. Регенерационный потенциал элитных форм малины в культуре *in vitro*: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05. Брянск, 2012. 22 с.

17. Pu-nyarani Kshctrimayum, Sharma G. Jitendra Micropropagation Costus speciosus (Koen.) Sm. using nodal segment culture. Not. sci. biol. 2010. № 1. P. 58–62.

18. Response of *in vitro* strawberry to antibiotics / Y.H. Qin et al. Plant Growth Regulation. 2011. Vol. 65. № 1. P. 183–193.

19. High efficiency *in vitro* plant regeneration from epicotyl explants of Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) / Zeng Lihui et al. In Vitro Cell and Dev. Biol. Plant. 2009. Vol. 45, № 5. P. 559–564.

20. Zou Ying-Ning. Micropropagation of Chinese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) Using Mature Stem Segments. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. Vol. 38(3). P. 214–218. URL: <https://doi.org/10.15835/nbha3834614>, 2010. Vol. 38, № 3. P. 214–218.

#### REFERENCES

1. Samarina, L.S., Kolomic, T.M. (2009). Osobnosti mikrorazmnozhenija *C. limon* v uslovijah *in vitro*. Biotehnologija v rastenievodstve, zhivotnovodstve i veterinarii: materialy IX molodezhnoi nauchnoi konferencii [Peculiarities of micropropagation of *C. limon* *in vitro*. Biotechnology in plant growing, animal husbandry and veterinary medicine: materials of the IX youth scientific conference]. Moscow, VNI SB, pp. 25–26.

2. Gorshkov, V.M., Samarina, L.S., Kolomic, T.M. (2009). Jekologicheskie i biologicheskie osobnosti osnovnyh vidov roda *Citrus* dlja promyshlennogo vzdelyvanija [Ecological and biological characteristics of the main species of the genus *Citrus* for industrial cultivation]. Subtropicheskoe i juzhnoe sadovodstvo Rossii [Subtropical and southern Russian gardening]. Vol. 2, pp. 250–255.

3. Samarina, L.S., Kolomic, T.M. (2010). Regeneracija limona *in vitro* iz steblevykh pochek i nucelljarnykh zarodyshej. Nauchnoe obespechenie APK: sb. tez. IV nauch.-prakt. conf. molodyh uchenykh [Regeneration of lemon *in vitro* from stem buds and nucellar embryos. Scientific support of the agro-industrial complex: sat. thesis. IV scientific-practical. conf. young scientists]. Krasnodar, pp. 220–222.

4. Samarina, L.S., Kolomic, T.M., Nalbantova, N.S. (2012). Mikroklonal'noe razmnozhenie citrusovykh kul'tur i ih podvoev. Nauchnoe obespechenie APK: sb. tez. VI nauch.-prakt. conf. molodyh uchenykh [Microclonal reproduction of citrus crops and their rootstocks: Scientific support of the agro-industrial complex: sat. thesis. VI scientific-practical. conf. young scientists]. Krasnodar, pp. 51–53.

5. Kushnir, G.P., Samac'ka, V.V. (2005). Mikroklonal'ne rozmnozhenija roslyn, teorija i praktyka [Microclonal plant propagation, theory and practice]. Kyiv, Scientific thought, 270 p.

6. Podgajec'kyj, A.A., Mackevych, V.V., Podgajec'kyj, A.A. (2018). Osoblyvosti mikroklonal'nogo rozmnozhenija vydiv roslyn: monografija [Features of microclonal reproduction of plant species]. Bila Tserkva, BNAU, 209 p.

7. Butenko, R.G. (1993). Biotehnologii na osnove kul'tiviruemykh *in vitro* kletok rastenij [Biotechnology based on in

vitro cultured plant cells]. Agrarnaja nauka [Agricultural science], no. 4, pp. 25–27.

8. Lejke, G., Labes, R., Jertel', K. (1980). Ispol'zovanie kul'tury tkanej i organov v selekcii rastenij i proizvodstve posadochnogo materiala. Petersdorf [The use of tissue culture and organs in plant breeding and the production of planting material. Petersdorf]. Moscow, Kolos, 77 p.

9. Kunah, V.A. (2005). Biotehnologija likars'kyh roslyn [Biotechnology of medicinal plants]. Genetychni ta fiziologo-biohimichni osnovy [Genetic and physiological and biochemical bases]. Kyiv, Logos, 730 p.

10. Murashige, T., Skoog, F. (1962). Arevised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Phys. Pia. 15, no. 3, pp. 473–497.

11. Melnychuk, M.D., Hryhoriuk, I.P., Novak, T.V., Kliachenko, O.L., Kolomiets, Yu.V., Splydonov, V.H., Kliuvadenko, A.A., Antipov, I.O., Overchenko, V.V., Oblap, R.V., Novak, N.B. (2011). Biotehnologija roslyn: navch. posib. [Plant biotechnology]. Kyiv, NULES Publishing Center of Ukraine, 216 p.

12. Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. Annu. Rev. Plant Physiol. Vol. 25, pp. 135–166.

13. Buntsevych, L.L., Kostiuk, M.A., Zakharchenko, R.S., Paletskaia, E.N. (2012). Issledovanie jeffektivnosti antibiotikov i sterilizatorov novogo pokolenija dlja podavlenija bakterial'noj i gribnoj kontaminacii srede i jeksplantov [Investigation of the effectiveness of new generation antibiotics and sterilizers for suppressing bacterial and fungal contamination of the environment and explants]. Plodovodstvo i vinogradarstvo Juga Rossii [Fruit growing and viticulture of the South of Russia], no. 16.

14. Bunceovich, L.L., Kostjuk, M.A., Paleckaja, E.N. (2011). Sovershenstvovanie sistemy proizvodstva vysokokachestvennogo bezvirusnogo posadochnogo materiala plodovyh i jagodnyh kul'tur [Improving the production system of high-quality virus-free planting material for fruit and berry crops]. Razrabotki, formirujushhie sovremennyj oblik sadovodstva: monografija [Developments shaping the modern face of horticulture]. Krasnodar, GNU SKZNIISiV, pp. 254–275.

15. Granda, H.R.K. (2009). Mikroklonal'noe razmnozhenie hrizantem [Micropropagation of chrysanthemums]. Izv. TSHA [News of TSKHA], no. 1, pp. 145–148.

16. Cheljaev, D.N. (2012). Regeneracionnyj potencial jelitnyh form maliny v kul'ture in vitro: avtoref. dis. ... kand. s.-h. nauk: 06.01.05 [Regeneration potential of elite raspberry forms in in vitro culture: abstract of dissertation of the candidate of agricultural sciences]. Brjansk, 22 p.

17. Pu-nyarani, Kshetrimayum, Sharma, G. (2010). Jitendra Micropropagation Costus speciosus (Koen.) Sm. using nodal segment culture. Not. sci. biol. no. 1, pp. 58–62.

18. Qin, Y.H., Jaime A. Teixeira, da Silva, Bi, J.H., Zhang, S.L., Bu, G.B. Response of in vitro strawberry to antibiotics. Plant Growth Regulation. 2011. Vol. 65, no. 1, pp. 183–193.

19. Zeng, Lihui, Xu, Haifeng, Zeng Yunqi, Luan Aiye, Wang Huiquang (2009). High efficiency in vitro plant regeneration from epicotyl explants of Ponkan Man-darin (*Citrus reticulata* Blanco). In Vitro Cell and Dev. Biol. Plant. Vol. 45, no. 5, pp. 559–564.

20. Zou, Ying-Ning. Micropropagation of Chinese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) Using Mature Stem Segments.

Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, Vol. 38(3), pp. 214–218. Available at: <https://doi.org/10.15835/nbha3834614>

### Определение эффективного способа стерилизации растительных эксплантов лайма *Citrus aurantifolia* и сортов лимона *Citrus lemon* для введения в культуру in vitro

Шох С.С., Сыч З.Д., Карпук Л.М.

Цитрусовые растения, которые выращивают в горшке, пользуются неизменным спросом, однако размножение таких растений требует использования зимней теплицы и нескольких хорошо развитых маточных растений для получения посадочного материала. Использование микроклонального размножения позволяет ускорить получение семенного материала, однако требует детальной разработки методики культивирования in vitro.

Целью исследований было изучение эффективности стерилизационных веществ и способов стерилизации на выход жизнеспособных микропобегов растений лайма (*Citrus aurantifolia*) и сортов лимона Мейера и Юбилейный и их рост в культуре in vitro.

Исследования проводили на базе межкафедральной биотехнологической лаборатории агробиотехнологического факультета БНАУ. Исходным материалом использовали микропобеги из растений лайма (*Citrus aurantifolia*) и сортов лимона (*Citrus lemon*) Мейера и Юбилейный. Объекты исследования избраны по разнородности генотипов, типу развития и сортовым особенностям. Особенностью культуры in vitro является возможность использования для размножения различных частей растений. В исследованиях использовали микропобеги с почкой.

Для обезвреживания экзогенной бактериальной и грибковой микрофлоры использовали 70 % раствор этанола  $C_2H_5OH$ , гипохлорит натрия 5 %, 15 % раствор пероксида водорода  $H_2O_2$ , сулемы (0,1) и отмывали в стерильной воде (один раз в 5–10 мин) по нескольким схемам.

Установлено влияние различных режимов стерилизации для получения стерильных эксплантов и введения в культуру растений вида лайма *Citrus aurantifolia* и сортов лимона Мейера и Юбилейный. Выявлено, что использование ступенчатой стерилизации с использованием 2,5 % раствора гипохлорита натрия дает высокий процент стерильного жизнеспособного материала – 27,7 %, что существенно больше, чем другие варианты опыта.

**Ключевые слова:** микропобеги, лайм, стерильный материал, микроразмножение, стерилизация, пероксид водорода, жизнеспособность эксплантов

### Determination of an effective method of *Citrus aurantifolia* lime and *Citrus lemon* varieties plant explants sterilization for in vitro introduction into the culture

Shokh S., Sych Z., Karpuk L.

Potted citrus plants are in constant demand, but the propagation of such plants requires the use of a winter greenhouse and several well-developed mother plants to obtain planting material. The use of microclonal propagation can accelerate the production of seed material though it requires detailed development of in vitro cultivation techniques.

The aim of the research was to study the effectiveness of sterilizing substances and methods of sterilization on the

yield of viable micro shoots of lime plants (*Citrus aurantifolia*) as well as Meyer and Jubilee lemon varieties and their growth in vitro.

The research was conducted in the interdepartmental "Biotechnological Laboratory" of the Agrobiotechnological Faculty of Bila Tserkva NAU. The source material was microshoots from lime plants (*Citrus aurantifolia*), and lemon varieties (*Citrus lemon*) Meyer and Jubilee. The objects of the study were selected according to the diversity of genotypes, development type and varietal characteristics. The possibility of using different parts of plants for reproduction is a feature of in vitro culture. We used microshoots with a bud in our research.

To neutralize the exogenous bacterial and fungal microflora, we used 70 % ethanol solution  $C_2H_5OH$ , sodium hy-

pochlorite 5 %, 15 % solution of hydrogen peroxide  $H_2O_2$ , sulema (0.1) and washed the material in sterile water (for 5–10 min) under several schemes.

The study revealed the influence of different sterilization regimes for obtaining sterile explants and the introduction into plant culture of explants of the species of lime *Citrus aurantifolia* as well as Meyer and Jubilee lemon varieties. It was found that the use of step sterilization using 2.5 % solutions of sodium hypochlorite gives a high percentage of sterile viable material – 27.7 %, which is significantly higher than in other variants of the experiment.

**Key words:** microshoots, lime, sterile material, micropropagation, sterilization, hydrogen peroxide, viability of explants.



Copyright:Шох С.С., Сич З.Д., Карпук Л.М. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



Шох С.С.  
Карпук Л.М.

ID: <https://orcid.org/0000-0002-4141-8898>  
ID: <https://orcid.org/0000-0002-2303-7899>