

Peculiarities of the sterilization of *Hydrangea* L. explants during introduction into *in vitro* culture

M. Osipov✉

Article info

Correspondence Author

M. Osipov

E-mail:

landscape1@meta.uaUman National University,
1 Instytutska Str., Uman,
20301, Ukraine**Citation:** Osipov, M. (2026). Peculiarities of the sterilization of *Hydrangea* L. explants during introduction into *in vitro* culture. *Scientific Progress & Innovations*, 29(2), 13–16. doi: 10.31210/spi2026.29.02.02

This article examines the effectiveness of sterilizing agents and sterilization methods for *Hydrangea* explants during their introduction into *in vitro* culture. The starting material for *in vitro* culture consisted of microshoots with apical meristems excised from 3- to 5-year-old plants of *H. macrophylla* 'Nikko Blue', *H. arborescens* 'Annabelle', and *H. paniculata* 'Grandiflora'. It was established that the most effective sterilizing agent was a 0.1 % solution of mercuric chloride (HgCl₂). Its application with an exposure time of 1–1.5 min resulted in 67.2–85.5 % sterile microshoots, of which 62.8–73.3 % were viable. Increasing the exposure time to 2.0 min led to a decrease in explant viability to 54.7 %. The least effective sterilizing agent was 2.5 % sodium hypochlorite (NaOCl), which resulted in up to 55.8 % sterile explants across all exposure times. Treatment with a 1.0 % silver nitrate (AgNO₃) solution yielded a higher proportion of sterile explants compared to sodium hypochlorite; however, their viability was the lowest among all treatments. After 2 min of exposure, the proportion of sterile explants reached 72.8 %, but only 20.5 % remained viable. It was also found that explants of all studied species and cultivars of the genus *Hydrangea*, collected and introduced into *in vitro* culture in May, showed lower contamination levels; however, the proportion of sterile viable explants was significantly lower (19.4–20.6 %) compared to those collected and introduced into culture in July. It was determined that the highest yield of viable sterile explants was obtained when they were introduced into *in vitro* culture during July 5–25, with average values of 65.1–67.2 % for the studied species and cultivars of hydrangea, respectively. The lowest percentage of viable explants was observed when explants were introduced into culture on May 5, ranging from 17.9 % to 20.6 %. Meristem development, as well as the expression or suppression of totipotency, depended on the conditions under which the explants were introduced into *in vitro* culture. The best results were achieved by culturing sterilized plant material on a nutrient medium at an air temperature of 25±1°C, with a 16-hour photoperiod, a light intensity of 1–3 klx, and a relative humidity of 75 %.

Keywords: hydrangea, microshoots, viability, sterilizing agent, exposure.

Особливості стерилізації експлантів *Hydrangea* L. за введення в культуру *in vitro*

М. Ю. Осіпов

Уманський національний
університет,
м. Умань, Україна

У статті висвітлено питання вивчення ефективності стерилізаційних речовин та способів стерилізації експлантів гортензії при введенні в культуру *in vitro*. Вихідним матеріалом для введення в культуру *in vitro* були мікропагони з апікальною меристемою відібрані з 3–5-річних рослин *H. macrophylla* 'Nikko Blue', *H. arborescens* 'Annabelle', *H. paniculata* 'Grandiflora'. Визначено, що найефективнішим стерилізатором є розчин 0,1 % дихлориду ртуті (HgCl₂). Його застосування за експозиції 1–1,5 хв. забезпечило отримання 67,2–85,5 % стерильних мікропагонів, з яких 62,8–73,3 % були життєздатними. Збільшення часу стерилізації HgCl₂ до 2,0 хв. призвело до втрати життєздатності експлантів, яка становила 54,7 %. Найменш ефективним стерилізатором виявився 2,5 % гіпохлорит натрію (NaOCl), який забезпечив отримання до 55,8 % стерильних експлантів за всіх експозицій. Стерилізація експлантів у розчині 1,0 % нітрату срібла (AgNO₃) забезпечила отримання більшої кількості стерильних експлантів, ніж стерилізація в розчині гіпохлориту натрію, однак їхня життєздатність була найнижчою порівняно з іншими стерилізаторами. За стерилізації упродовж 2 хв. вихід стерильних експлантів становив 72,8 %, але лише 20,5 % було життєздатних. Виявлено, що живці всіх видів і сортів роду *Hydrangea*, відібрані та введені в культуру *in vitro* у травні, були менш заражені, але кількість стерильних життєздатних експлантів була значно меншою і становила від 19,4 до 20,6 %, порівняно з живцями, відібраними та введенними в культуру у липні. Визначено, що найвищий вихід життєздатних стерильних експлантів отримано при введенні їх у культуру *in vitro* 05–25 липня, який у середньому за видами та сортами гортензії становив 65,1–67,2 % відповідно. Найнижчою кількістю життєздатних експлантів була за введення в їх у культуру 05 травня та становила 17,9 та 20,6 %. Розвиток меристем, експресія або пригнічення тотипотентності залежали від умов, у які експланти потрапляли в культуру *in vitro*. Кращі результати отримано при висаджуванні стерилізованого рослинного матеріалу на живильне середовище і культивуванні за температури повітря 25±1 °C при 16-годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 1–3 клк та відносній вологості 75 %.

Ключові слова: гортензія, мікропагони, життєздатність, стерилізатор, експозиція.

Бібліографічний опис для цитування: Осіпов М. Ю. Особливості стерилізації експлантів *Hydrangea* L. за введення в культуру *in vitro*. *Scientific Progress & Innovations*. 2026. № 29 (2). С. 13–16.

Вступ

Мікроклональне розмноження рослин є одним з перспективних напрямів сучасної біотехнології, що активно впроваджується у виробництво [1]. Перевагами розмноження *in vitro* є висока мультиплікативна здатність за відносно короткий проміжок часу, створення здорових та вільних від хвороб рослин і здатність генерувати пагони упродовж року [2, 3]. Основними факторами, що впливають на швидкість розмноження, є вік джерела експлантату, тип експлантату, склад середовища, вимоги до освітлення та частота пересадки [4, 5]. Асептичність експлантів має важливе значення для мікроклонального розмноження рослин [6]. Стерилізація вихідного матеріалу є важливим етапом розмноження *in vitro*, оскільки на поверхні рослин і їхніх частинах, пагонах, бруньках, проростках та інших джерелах експлантів знаходиться велика кількість різних мікроорганізмів, бактерій, грибів, які здатні рости і розмножуватися на живильному середовищі [7, 8]. За введення таких експлантів в культуру бактерії та гриби поглинають поживні речовини живильного середовища та виділяють токсини, які накопичуються в середовищі, гальмують ростові процеси в клітинах рослин і за тривалого впливу спричиняють їх загибель. Тому від якості стерилізації залежить успіх подальшого культивування [9, 10].

Ефективність стерилізувальної речовини залежить від її виду, концентрації, підготовки експлантів та тривалості експозиції. Крім цього, успішне проходження процесу залежить від щільності та чутливості тканини, що контактує із антисептиком [11, 12]. Під час добору стерилізуючих речовин необхідно враховувати їхню здатність ефективно пригнічувати розвиток мікроорганізмів за мінімального пошкодження рослинних тканин. Ці речовини мають легко видалятися із тканин рослини промиванням дистильованою водою або розкладатися, щоб запобігти отруєнню тканин [13, 14]. Не менш важливим є забезпечення стерильності не лише експлантів, а й поживного середовища, приміщення, посуду, інструментів і допоміжних матеріалів [15].

Дослідження *in vitro* десяти сортів *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. та двох сортів *Hydrangea paniculata* Siebold найкращі результати отримано при використанні твердого середовища Гамборга 0,5× у поєднанні зі сумішшю для консервування рослин (PPM) та стерилізацією насіння трихлор-*s*-триазинтріоном (Trichlor). Аналізи фізіології проводилися шляхом стерилізації насіння та обробки комбінаціями білого й червоного світла, холодом, гібереловою кислотою та нітратом калію, а також світлових циклів. Встановлено, що найсприятливіші умови для проростання насіння гортензії забезпечували обробка холодом упродовж шести тижнів, просочування GA_3 + KNO_3 та висів на середовище Гамборга половинної концентрації з доповненням GA_3 , у присутності білого світла [16].

У дослідженнях Sacco et al. [17] у якості експлантів було взято невеликі пагони та зачатки, які зрізалися у жовтні, квітні та травні з вегетативних гілок і стерилізувалися послідовно в етанолі, NaOCl,

дистильованій та стерильній воді. Для створення культур *in vitro* використовувалося сольове середовище MS з вітамінами, доданими до ВА ($0,5 \text{ мг л}^{-1}$) та сахарози (30 г л^{-1}).

Мета дослідження

Мета досліджень – визначення ефективних способів стерилізації експлантів гортензії за введення в культуру *in vitro* з подальшим підбором живильного середовища.

Матеріали і методи

Лабораторні дослідження проводили упродовж 2020–2024 років у Національному дендрологічному парку «Софіївка» НАН України. Як вихідний матеріал для введення в культуру *in vitro* використовували пагони з апікальною меристемою довжиною 1,0–1,5 см, взяті з 3–5-річних рослин. Дослідження проводили з представниками роду *Hydrangea*, зокрема: *H. macrophylla* 'Nikko Blue', *H. arborescens* 'Annabelle' та *H. paniculata* 'Grandiflora'. Перед стерилізацією експланти промивали у проточній воді, після цього їх занурювали у водний розчин стерилізатора та тричі ополіскували дистильованою водою. Для підвищення ефективності стерилізації до розчину додавали 1–2 краплі Твину-80. Розчин стерилізатора включав: 2,5 % гіпохлориту натрію (NaOCl), 0,1 % дихлориду ртуті (HgCl_2) та 1,0 % нітрату срібла (AgNO_3). Після промивання стерильною водою експланти висаджували на модифіковане живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС).

Ефективність стерилізації визначали, підраховуючи кількість стерильних та інфікованих експлантів у кожному варіанті, упродовж семи діб. Життєздатність експлантів оцінювали через 25 діб.

Результати та їх обговорення

Дослідженнями Onica et al. [18] виявлено, що ефективність стерилізації рослин *H. macrophylla* залежала від стерилізуючого розчину та тривалості його застосування. За багатоетапної стерилізації з використанням етанолу, дихлорізоціанурату натрію (NaDCC , 0,2–2 %), перманганату калію та фунгіциду (Dithane) або дезінфікуючого засобу на основі хлору (Domestos) виявлено, що найбільш ефективною була стерилізація експлантів 0,2 % Dithane упродовж 7 хв. перед обробкою NaDCC . Багаторазове промивання та проміжне витримання у перманганаті калію виявилися критично важливими для поліпшення асептичних умов. За дослідження методики отримання стерильної культури *in vitro* *H. paniculata* виявлено, що найбільшу кількість життєздатних (92 %) експлантів отримано за послідовної обробки верхівкових та пазушних бруньок з весняних пагонів відростання у 3 % розчині перекису водню упродовж 3 хв. та 7 % розчині гіпохлориту натрію упродовж 4 хв. [19].

У результаті проведених досліджень визначено, що найефективнішим стерилізатором був розчин 0,1 % дихлориду ртуті (HgCl_2), який забезпечив

одержання найбільшої кількості стерильних мікропагонів – 67,2–85,5 % за експозиції 1–1,5 хв., з яких життєздатними були 62,8–73,3 %. Збільшення часу стерилізації HgCl_2 до 2,0 хв. призвело до втрати життєздатності експлантів. Частка життєздатних експлантів становила 54,7 % і вони були непридатні для подальшого культивування (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив стерилізації експлантів рослин роду *Hydrangea*

Розчин для стерилізації	Термін стерилізації, хв.	Кількість експлантів, %	
		стерильних	життєздатних
2,5 % гіпохлорит натрію (NaOCl)	1,0	0,5	0
	1,5	46,3	32,1
	2,0	55,8	43,4
0,1% дихлорид ртуті (HgCl_2)	1,0	67,2	62,8
	1,5	85,5	73,3
	2,0	85,6	54,7
1,0 % нітрат срібла (AgNO_3)	1,0	48,8	27,2
	1,5	57,3	31,2
	2,0	72,8	20,5

Найнижчу ефективність стерилізації отримано при використанні розчину 2,5 % гіпохлориту натрію (NaOCl) за всіх експозицій. Збільшення тривалості стерилізації від 1,0 до 2,0 хвилин сприяло збільшенню кількості стерильних експлантів з 0,5 до 55,8 %, але їхня життєздатність була дуже низькою та становила 43,4 %.

За стерилізації експлантів у розчині 1,0 % нітрату срібла (AgNO_3) отримано більшу кількість стерильних експлантів, ніж за стерилізації у розчині гіпохлориту натрію, однак їхня життєздатність була найнижчою порівняно з іншими стерилізаторами. За

Таблиця 2

Життєздатність стерильних експлантів залежно від строків введення, %

Вид, сорт	Дата введення в культуру							
	05.05.	10.05.	25.05.	30.05.	05.07.	10.07.	25.07.	30.07.
<i>H. macrophylla</i> 'Nikko Blue'	20,6	35,1	46,9	57,9	66,5	67,2	65,1	44,6
<i>H. arborescens</i> 'Annabelle'	17,9	29,9	45,5	55,5	66,1	67,2	64,2	43,5
<i>H. paniculata</i> 'Grandiflora'	19,4	30,9	49,1	58,2	67,2	68,1	65,3	45,7
Середнє	19,6	32,4	47,3	57,3	66,1	67,2	64,2	44,4

Визначено, що найвищий вихід життєздатних стерильних експлантів отримано при введенні їх у культуру *in vitro* у період з 05 по 25 липня. Середня кількість життєздатних експлантів у цей період коливалася у межах 65,1–67,2 %, залежно від генотипу. Саме тому вказаний термін введення експлантів є найкращим для досліджених видів роду *Hydrangea*.

Розвиток меристем, експресія або пригнічення тотипотентності значною мірою залежали від умов, у які експланти потрапляли в культуру *in vitro*. Важливе значення мали освітлення, температурний режим і вологість. Кращі результати отримано за висаджування стерилізованого рослинного матеріалу на живильне середовище і культивування за температури повітря $25 \pm 1^\circ\text{C}$ та 16-ти годинного фотоперіоду з інтенсивністю освітлення 1–3 клк та відносної вологості 75 %.

стерилізації у 1,0 % нітраті срібла (AgNO_3) упродовж 2 хв. вихід стерильних експлантів становив 72,8 %, однак з них лише 20,5 % були життєздатними. Таким чином, встановлено, що найефективнішою речовиною для стерилізації при введенні мікропагонів з апікальною меристемою в ізолювану культуру є 0,1 % водний розчин дихлориду ртуті за експозиції 1,5–2,0 хвилин.

Отримані результати узгоджуються з попередньо отриманими результатами досліджень Sisko [20], у яких за стерилізації на основі NaOCl життєздатність експлантів була найнижчою.

На початковому етапі введення рослинного матеріалу в культуру велике значення має отримання неінфікованого життєздатного вихідного матеріалу. На отримання такого матеріалу впливають терміни відбирання та введення в культуру експлантів, а також середовище й умови пророщування.

Строки відбору експлантів та їх введення в культуру впливають на успішність мікроклонального розмноження, що пов'язано з їх онтогенетичним станом і часом введення в культуру. Пагони для введення в культуру *in vitro* відбирали навесні – в травні та влітку – у фазі цвітіння.

З'ясовано, що строки відбору та введення в культуру *in vitro* експлантів впливали на їх життєздатність (табл. 2). Виявлено, що живці усіх видів і сортів роду *Hydrangea*, відібрані та введені в культуру *in vitro* навесні, були менш заражені, але кількість стерильних життєздатних експлантів була значно меншою і становила від 19,4 до 20,6 %, порівняно з живцями відібраними і введенними в культуру влітку, що зумовлено фізіологічним їх станом та впливом хімічних реагентів.

Висновки

Визначено, що за стерилізації експлантів найбільшу кількість стерильних мікропагонів одержано при використанні 0,1 % розчину дихлориду ртуті (HgCl_2) за експозиції 1–1,5 хв. З 67,2–85,5 % отриманих стерильних експлантів життєздатними були 62,8–73,3 %. Збільшення часу стерилізації HgCl_2 до 2,0 хв. призвело до зниження на 8,1–18,6 % життєздатності експлантів. Найнижчою була ефективність стерилізації при використанні розчину 2,5 % гіпохлориту натрію (NaOCl) за всіх експозицій. Збільшення тривалості стерилізації від 1,0 до 2,0 хвилин сприяло збільшенню кількості стерильних експлантів з 0,5 до 55,8 %, однак їхня життєздатність була низькою та не перевищувала 43,4 %. За стерилізації експлантів у розчині 1,0 % нітрату срібла (AgNO_3) отримано більшу кількість стерильних

експлантів, ніж за стерилізації у розчині гіпохлориту натрію, однак їхня життєздатність була найнижчою і коливалася в межах 20,5–31,2 %, залежно від експозиції.

З'ясовано, що строки відбору та введення в культуру *in vitro* впливали на життєздатність експлантів. Живці усіх видів і сортів гортензії, відібрані та введені у культуру *in vitro* навесні, були менш заражені, однак середня кількість життєздатних експлантів була значно меншою, порівняно з живцями, відібраними і внесеними в культуру влітку, і становила 19,4–20,6 %.

Перспективи подальших досліджень передбачають підбір складу живильного середовища для підвищення ефективності клонального мікророзмноження видів роду *Hydrangea* L.

ДЕКЛАРАЦІЇ

Етична заява

Не застосовується.

Фінансування

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування.

Конфлікт інтересів

Автор стверджує про відсутність конфлікту інтересів.

Подяки

Немає.

Декларація щодо використання ШІ та технологій на основі ШІ

Автор заявляє, що не використовував штучний інтелект або технології на основі ШІ під час підготовки цього рукопису.

References

1. Rybalchenko, A. M., & Kryvoruchko, L. M. (2024). Microclonal reproduction in *in vitro* culture: Possibilities and advantages of use. *Ukrainian Journal of Natural Sciences*, 10, 150–157. <https://doi.org/10.32782/naturaljournal.10.2024.14>
2. Khan, Z., Akram, A., Irfan, M., & Khan, K. (2025). Cloning of plant cells: Different methods of cloning and its applications – Advantages and disadvantages of plant cell cloning. In D. Singh, D. N. Chauhan, N. S. Chauhan, & M. Singh (Eds.), *Plant biotechnology: The medicinal and phytopharmaceutical aspects* (1st ed., pp. 103–119). CRC Press.
3. Vinoth, A., & Ravindhran, R. (2013). *In vitro* propagation – A potential method for plant conservation. *International Journal of Computer Algorithm*, 2, 268–272.
4. Mehbub, H., Akter, A., Akter, M. S. H., Mandal, M. S. H., Hoque, Md. A., Tuleja, M., & Mehraj, H. (2022). Tissue culture in ornamentals: Cultivation factors, propagation techniques, and its application. *Plants*, 11 (23), 3208. <https://doi.org/10.3390/plants11233208>
5. Kumar, M., Sirohi, U., Malik, S., Kumar, S., Ahirwar, G. K., Chaudhary, V., Yadav, M. K., Singh, J., Kumar, A., Pal, V., & Prakash, S. (2022). Methods and factors influencing *in vitro* propagation efficiency of ornamental tuberose (*Polianthes* Species): A systematic review of recent developments and future prospects. *Horticulturae*, 8(11), 998. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8110998>

6. Chornobrov, O. Yu., & Tkachova, O. E. (2021). Optimization of explants *in vitro* sterilization protocol of some deciduous tree species. *Ukrainian Journal of Forest and Wood Science*, 12(3), 80. <https://doi.org/10.31548/forest2021.03.007>
7. Gautam, N., Faroda, P., Agarwal, T., Harish, & Gupta, A. K. (2024). Effect of microclimatic physical factors on *in vitro* morphogenesis of plants: a systematic review. *Discover Agriculture*, 2(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s44279-024-00022-5>
8. Mosoh, D. A., Khandel, A. K., Verma, S. K., & Vendrame, W. A. (2023). Effects of sterilization methods and plant growth regulators on *in vitro* regeneration and tuberization in *Gloriosa superba* (L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 59(6), 792–807. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10387-9>
9. Krens, F. A., & Jamar, D. (1989). The role of explant source and culture conditions on callus induction and shoot regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Plant Physiology*, 134(6), 651–655. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(89\)80022-7](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(89)80022-7)
10. Mosoh, D. A., Khandel, A. K., Verma, S. K., & Vendrame, W. A. (2023). Effects of sterilization methods and plant growth regulators on *in vitro* regeneration and tuberization in *Gloriosa superba* (L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 59(6), 792–807. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10387-9>
11. Davoudpour, Y., Schmidt, M., Calabrese, F., Richnow, H. H., & Musat, N. (2020). High resolution microscopy to evaluate the efficiency of surface sterilization of Zea Mays seeds. *Plos One*, 15(11), e0242247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242247>
12. Sahu, P. K., Tilgam, J., Mishra, S., Hamid, S., Gupta, A. K., Verma, S. K., & Kharwar, R. N. (2022). Surface sterilization for isolation of endophytes: Ensuring what (not) to grow. *Journal of Basic Microbiology*, 62(6), 647–668. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100462>
13. Kiran, Garg, V., Dutt, R., Singh, M. R., Singh, D., & Singh, R. P. (2025). Sterilization methods and techniques involved in tissue culture, with protocols to sterilize different plant parts. In D. Singh, D. N. Chauhan, N. S. Chauhan, & M. Singh (Eds.), *Plant biotechnology: The medicinal and phytopharmaceutical aspects* (pp. 61–73). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003326939-7>
14. Permadi, N., Nurzaman, M., Alhasnawi, A. N., Doni, F., & Julaehe, E. (2023). Managing Lethal Browning and Microbial Contamination in *Musa* spp. tissue culture: Synthesis and perspectives. *Horticulturae*, 9(4), 453. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040453>
15. Nagamani, J. E., Indu, B. K., Subbalakshmi, G., & Anuradha, M. (2025). Laboratory design and functionality. In M. Anuradha & S. Balasubramanya (Eds.), *In vitro production of plant secondary metabolites* (pp. 35–56). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-97-8808-8_3
16. Greer, S. P., & Rinehart, T. A. (2010). Dormancy and germination *in vitro* response of *Hydrangea macrophylla* and *Hydrangea paniculata* seed to light, cold-treatment and gibberellic acid. *Journal of Environmental Horticulture*, 28(1), 41–47. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-28.1.41>
17. Sacco, E., Savona, M., Antonetti, M., Grassotti, A., Pasqualetto, P. L., & Ruffoni, B. (2012). *In vitro* propagation and regeneration of several *Hydrangea* genotypes. *Acta Horticulturae*, 937, 565–572. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2012.937.68>
18. Onica, N., Nicolae, I. C., Roșca, I., Tabăra, M., Ciorchină, N., Glijin, A., & Venat, O. (2025). Genotype-dependent responses to sterilization and reesterilization in *in vitro* cultures of *Hydrangea macrophylla*. *AGROFOR International Journal*, 10(3), 48–56.
19. Zaripova, A. (2024). Obtaining aseptic *in vitro* culture of *Hydrangea paniculata* 'Samarskya Lydia'. *BIO Web of Conferences*, 121, 01008. <https://doi.org/10.1051/bioconf/202412101008>
20. Šiško, M. (2016). *In vitro* tissue culture initiation from potted and garden *Hydrangea macrophylla* explants. *Agricultura*, 13(1-2), 65–69. <https://doi.org/10.1515/agricultura-2017-0008>

ORCID

M. Osipov 

<https://orcid.org/0000-0001-7004-1164>



2026 by the author(s). This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.