

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**МАЦКЕВИЧ ВЯЧЕСЛАВ ВІКТОРОВИЧ**

УДК

606:581.143.6

ДИСЕРТАЦІЯ  
**МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ВИДІВ РОСЛИН *IN VITRO* ТА  
ЇХ ПОСТАСЕПТИЧНА АДАПТАЦІЯ**

06.01.05 – селекція і насінництво

Подається на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ / В. В. Мацкевич /

Науковий консультант: ПОДГАСЦЬКИЙ АНАТОЛІЙ АДАМОВИЧ, доктор сільськогосподарських наук, професор

Суми – 2020

## АНОТАЦІЯ

Мацкевич В. В. Мікроклональне розмноження видів рослин *in vitro* та їх постасептична адаптація. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – «селекція і насінництво. Сумський національний аграрний університет МОН України, Суми, 2020.

На підставі багаторічних досліджень у дисертації наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуальної проблеми сільськогосподарського виробництва – використання мікроклонального розмноження видів рослин *in vitro* для звільнення від різного виду інфекції: бактеріальної, грибною та вірусної, збереження рослин у стані ювенілізації з урахуванням специфічного прояву їх біологічних особливостей та постасептична адаптація.

Доведено вплив різних частин організмів, їх онтогенетичної різноякісності, втрати інтегральних та кореляційних зв'язків за введення рослин у асептичну культуру. На прикладі шипшини, троянди виявлено оптимальне приживлення експлантів, виділених із «зеленого конусу» і не отримано жодного позитивного результату з використанням рослин, які знаходились у глибокому спокою. В актинідії такою виявилась апікальна частина пагона, туї західної – пагін проростка.

Залежно від місця знаходження інфекції, її типу, біологічних особливостей експлантів для деконтамінації слід використовувати різні речовини: Білизну (1:1) у поєднання з перманганатом калію, антибіотики (левоміцетин 125 мг/л + гентаміцин сульфат 80 мг/л), фунгіциди (Превікур Енерджі 840 SL, МАКСИМ ФОРТЕ, Фундазол (концентрації 3 мл/л), біоцид РММ (2 мл/л).

Розроблено модель запобігання утворення регенерантами фенолоподібних речовин. Доведено можливість соматоклональної мінливості в культурі *in vitro*, що дало змогу виділити клон павловнії 112-3.

Виявлено особливий прояв ювенілізації *in vitro* туї західної, картоплі. У павловнії, картоплі, хризантеми, гвоздики, хости мала місце онтогенетична різноякісність рослин *in vitro* залежно від походження живців. Виявлені способи зняття апікального домінування на період культивування і збільшення коефіцієнта розмноження у трьох сортів хости.

Встановлено детермінацію онтогенезу *in vitro* в картоплі під впливом зміни складу живильного середовища, низьких температур, режимів та спектра освітлення.

Доведено можливість нівелювання апікального домінування за використання цитокінінів: БАП (0,5 мг/л) на фоні ІМК (0,25 мг/л). Фітотоксичність БАП можна знизити, використовуючи гібереліни.

Розроблено заходи, які дали змогу мінімізувати гіпергідратацію пробіркових рослин. Виявлено вплив цитокінінів на бульбоутворення картоплі *in vitro*. Культивування картоплі на середовищі з картопляним крохмалем або екстрактом бульб, замість сахарози та агару, позитивно вплинуло на розвиток кореневої системи, стolonів, зменшило період від живцювання до бульбоутворення. У картоплі, ожини кращий ріст і розвиток рослин *in vitro* спостерігався після заміни халатної форми заліза в середовищі Мурасіге і Скуга на добриво Ferrileme 4.8 Orto-Orto.

Доведено позитивний вплив на ризогенез хости *in vitro* збільшення фотоперіоду з 8 до 16 годин на добу, а також заміна ІОК (1–5 мг/л) на ІМК (1–5 мг/л). Не виявлено істотної різниці в прояві показників коренеутворення у сорту хости Патріот після заміни активованого вугілля (1,5 г/л) на деревне (2,5 г/л).

Виявлено, що для приживлення живців під час постасептичної адаптації регенерантів сорту картоплі Подолянка кращими субстратами були гідрогелі та перліт.

**Ключові слова:** трав'янисті культури, чагарники, деревні, онтогенез *in vitro*, експлант, апікальні, медіальні, базальні частини пагона, деконтамінація, стерилізуючі речовини, склад живильного середовища, фенолоподібні речовини, соматоклональна мінливість, ювенілізація, апікальне домінування, субкультивування, детермінація органогенезу, інтенсивність освітлення, температура, фітогормони, мікробульби, форми заліза, модифіковані середовища, кислотність середовища, фотоперіод, активоване та деревне вугілля, субстрати.

### **Список наукових праць за темою дисертації**

#### **Монографія, підручник, навчальні посібники, науково-практичні посібники**

1. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В., Подгаєцький А. Ан. Особливості мікро-клонального розмноження видів рослин: (монографія) Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2018. 209 с. *(особистий внесок 45%)*
2. Власенко М. Ю., Вельямінова-Зернова Л. Д., Мацкевич В. В. Фізіологія рослин з основами біотехнології: підручник Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2006. 504 с. *(особистий внесок 30 %)*
3. Мацкевич В. В., Роговський С. В., Власенко М. Ю., Черняк В. М. Основи біотехнології рослин: навчальний посібник Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2010. 135 с. *(особистий внесок 45%)*
4. Подгаєцький А. А., Кабанець В. М., Кравченко Н. В., Подгаєцький А. Ан., Мацкевич В. В., Бордун Р. М. Розмноження та оздоровлення насінневого матеріалу картоплі: навчальний посібник. Суми: ПВКФ Видавництво «МакДен», 2019. 164 с. *(особистий внесок 15%)*
5. Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А., Філіпова Л. М. Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій): науково-

практичний посібник. Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2019. 84 с. (особистий внесок 45%)

6. Мацкевич О. В., Філіпова Л. М., Мацкевич В. В., Андрієвський В. В. Павловнія: науково-практичний посібник. Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2019. 80 с. (особистий внесок 35%)

### Статті у фахових виданнях України

1. Мацкевич В.В., Лященко С.А. Вплив віку вихідних рослин картоплі на ріст та розвиток регенерантів при живцюванні *«Картоплярство»*: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. 2006. Вип. 34-35. С. 79-84. (особистий внесок 75%)

2. Мацкевич Н.О., Пустовіт О.С., Власенко М.Ю., Мацкевич В.В. Особливості індивідуального розвитку картоплі при клональному мікророзмноженні. *Вісник Білоцерківського державного аграрного університету*. 2007. Вип. 46. С. 27-31. (особистий внесок 25%)

3. Мацкевич В.В., Власенко М.Ю., Войніцький І.І. Вплив хлорохолінхлориду та термоіндукції на бульбоутворення в рослин картоплі в умовах *in vitro*. *«Картоплярство»*: Міжвідомчий тематичний науковий збірник. 2007. Вип. 37. С. 33-37. (особистий внесок 45%)

4. Мацкевич В.В., Власенко М.Ю., Хоменко В. В. Особливості бульбоутворення з живців рослин *in vitro* сорту Подольська залежно від компонентів живильного середовища *«Картоплярство України»*: Науково-виробничий журнал. 2009. № 3-4 (16-17). С. 23-27. (особистий внесок 45%)

5. Мацкевич В.В., Власенко М.Ю., Кононенко О.І., Шовкун І.Ю. Індукування бульбоутворення та генезис асимілюючих органів рослин картоплі в асептичних і нативних умовах *Збірник наукових праць Уманського державного аграрного університету. Агронімія*. Умань. 2009. Вип. 71. С. 44-50. (особистий внесок 35%)

6. Мацкевич В.В., Власенко М.Ю., Філіпова Л.М. Ефективність тривалого клонального мікророзмноження *Thuja occidentalis* 'Smaragd'

залежно від компонентів живильного середовища та стану експлантів. *Збірник наукових праць Уманського державного аграрного університету. Агронія Умань*. 2010. Вип. 74. С.324-329. (особистий внесок 45%)

7. Мацкевич В.В., Власенко М.Ю., Філіпова Л.М. Детермінація онтогенезу рослин картоплі в умовах *in vitro* новими синтетичними фітогормонами *Таврійський науковий вісник. Херсонський державний аграрний університет*, Херсон. 2010. Вип 71. Ч. 2. С.12-18. (особистий внесок 35%)

8. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Власенко М.Ю., Дульнєв П.Г. Застосування нових синтетичних фітогормонів для детермінації онтогенезу рослин картоплі в умовах *in vitro*. *Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. Агронія*. Умань. 2011. Вип. 75. Ч. 1. С. 115-121. (особистий внесок 35%)

9. Мацкевич В.В., Козак Л.А., Філіпова Л.М. Особливості введення *in vitro* та клонального мікророзмноження *Astrophytum tyriostigma* та *Sclerocactus* sp. *Збірник наукових праць Білоцерківського державного аграрного університету. Агробіологія*. Біла Церква. 2012. Вип. 8 (94). С. 115-118. (особистий внесок 45%)

10. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Стадник А.П. Особливості введення *in vitro* та клонального мікророзмноження *Hosta* *Агроекологічний журнал*. 2012. Вип. 4. С. 81-88. (особистий внесок 45%)

11. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Удосконалення технології клонального мікророзмноження *Miscanthus giganteus*. *Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. Агронія*. Умань, 2012. Вип. 80, Ч. 1. С. 129-136. (особистий внесок 75%)

12. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Особливості регенерації рослин картоплі з живців залежно від субстрату та площі живлення. *Збірник наукових праць Білоцерківського державного аграрного університету. Серія Агробіологія*. Біла Церква. 2013. Вип. 10 (100). С. 30 –33. (особистий внесок 65%)

13. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Диба Р.Д. Особливості стерилізації експлантів хости. *Науковий вісник НЛТУ: збірник науково — технічних праць*. Львів: РВВ НЛТУ України. 2013. Вип. 23.5. С. 183-187. (особистий внесок 45%)
14. Matskevych V., Filipova L., Dyba R. *In vitro* regeneration introduction in dormancy state as a way of post-aseptic adaptation. *Агробіологія*. 2013. № 11 (104). С. 19-23. (особистий внесок 50%)
15. Філіпова Л., Мацкевич В. Утворення регенерантами фенолподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від умов та виду рослин. *Вісник Львівського національного аграрного університету. Агронія*. 2013. № 17 (2). С. 233-239. (особистий внесок 65%)
16. Стадник А.П., Філіпова Л.М, Мацкевич В.В. Екологічні особливості трофічної та гормональної детермінації ризогенезу *in vitro* регенерантів хости. *Агроекологічний журнал*. 2014. N 3. С. 75-80. (особистий внесок 35%)
17. Стадник А.П., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Пасічник Т.В. Деконтамінація та первинне культивування експлантів *Agarantus sp.* *Агроекологічний журнал*. 2015. № 2. С. 106-111. (особистий внесок 35%)
18. Matskevych V., Filipova L. Using cytokinin sinberries clonal micropropagation. *Збірник наукових праць Білоцерківського державного аграрного університету. Агробіологія*. Біла Церква. 2015. № 1 (117). С. 91-95. (особистий внесок 55%)
19. Matskevych V., Filipova L. Exogenous phytohormones influence on the blackberry (*Rubus Fruticosus* L.) regenerates development and tools of their reduction in postaseptic culture. *Збірник наукових праць Білоцерківського державного аграрного університету. Агробіологія*. Біла Церква. 2015. № 2 (118). С. 133-137. (особистий внесок 55%)
20. Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А. Особливості використання форми і кількості заліза за вирощування *in vitro* ожини і малини. *Науковий журнал Вісник Сумського національного аграрного університету. Агронія і біологія*. 2015. - Вип. 9 (30). С. 46-51. (особистий внесок 50 %)

21. Подгаєцький А.А., Мацкевич В.В., Врублевський А.Т. Використання біоциду РРМ як додаткового деконтамінанта в процесі мікроклонального розмноження рослинних об'єктів. *Науковий журнал Вісник Сумського національного аграрного університету. Агронія і біологія*. 2016. Вип. 9(32). С. 156-160. (особистий внесок 45%)

22. Скрипченко Н.В., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Кибенко І.І. Особливості мікроклонального розмноження представників роду *Actinidia*. *Інтродукція рослин: Міжнародний науковий журнал*. 2017. № 1. С. 88-96. (особистий внесок 35%)

23. Андрієвський В.В., Врублевський А.Т., Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., Мацкевич О.В. Проблеми мікроклонального розмноження фундука. *Агробіологія*. 1'2019. С. 74-84. (особистий внесок 35%)

24. Мацкевич В. В. Особливості детермінації онтогенезу павловнії *in vitro* синтетичними гормонами. *Науковий журнал Вісник Сумського національного аграрного університету. Агронія і біологія*. 2018. Вип. 9(36). С. 76-82.

25. Мацкевич В. В. Оптимізація введення в культуру *in vitro* кизилю. *Науковий журнал Вісник Сумського національного аграрного університету. Агронія і біологія*. 2018. Вип. 3(35). С. 113-118.

#### **Статті у міжнародних фахових виданнях**

26. Ищук Л.П., Мацкевич В.В. Размножение энергетических видов *Salix L. in vitro*. *Биотехнология и общество в XXI веке : сборник статей*. Барнаул : Изд-во ун-та , 2015. С. 352-356. (особистий внесок 50%)

27. Filipova L.M., Matskevych V.V., Karpuk L.M., Stadnyk A.P., Andriievsky V.V, Vrublevsky A.T., Krupa N.M., Pavlichenko A.A. Features of Rooting Paulownia *in vitro*. *Egypt.J.Chem.* 2019. 72nd. P.57-63. Журнал індексований у метричній базі Scopus. (особистий внесок 35%)

28. Мацкевич В.В., Таран О.П. Развитие туи западной (*Thuia occidentalis L.*) в асептической культуре и усовершенствование культуры *ex vitro*.



«Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира». Волгоград. 2010. С.235-240. (особистий внесок 70 %)

29. Подгаєцький А.А., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Кравченко Н. В., Гнітецький М.О. Адаптивність рослин на етапі *in vitro-ex vitro*. *East European Science Journal*. 2020. 4 (56). Part 2. P. 25-33. (особистий внесок 45%)

30. Podhaietskiy A. A., Matskevych V. V., Filipova L. M., Skripchenko N. V., Kravchenko N. V. Trophic and hormonal determinants of ontogenesis *Actinia chenensis var. deliciosa (A. Chev.) in vitro* at the cultivation stage: *East European Science Journal*. 2020 #10(62). P. 17-24. (особистий внесок 35%)

31. Podhaietskiy A. A., Matskevych V. V., Filipova L. M., Kravchenko N. V. Exogenous determinants of growth of *Pavlovnia* regenerant *in vitro*. *The scientific heritage*. 2020. Vol. 2. No. 53 (53). P. 5-15. (особистий внесок 35%)

#### **Праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації**

1. Васильківський С.П., Мацкевич В.В. Перспективи створення та функціонування фітобіотехнологічних лабораторій. Аграрна наука – виробництву. *Матеріали тез VI Державної науково-практичної конференції* 14-15 листопада 2007 року. Частина 1. м. Біла Церква. С. 17-18.

2. Власенко М.Ю., Мацкевич В.В., Дульнєв П.Г., Козак А.Л., Детермінація онтогенезу рослин картоплі в умовах *in vitro* синтетичними фітогормонами класу цитокінінів. *“Інноваційні агротехнології в умовах глобального потепління. Матеріали тез міжнародної науково-практичної конференції*. 4-6 червня. 2009 р. Мелітополь-Кирилівка. Вип. 1., с.24-25.

3. Таран О.П., Мищенко Л.Т., Мацкевич В.В. Использование новых синтетических фитогормонов и их аналогов в культуре картофеля *in vitro* и *ex vitro*. . *Инновационные фундаментальные и прикладные исследования в области химии сельскохозяйственному производству: Материалы III Международной Интернет-конференции*. Орел: Изд-во Орел ГАУ, 2010. С.36-41

4. Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., Вплив екзогенної сахарози на формування асимілюючих органів в рослин картоплі *in vitro*. *Новітні технології в рослинництві. Тези доповідей державної науково-практичної конференції 8-9 листопада 2012 року*. м. Біла Церква. С. 3.

5. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Введення регенерантів *in vitro* у стан спокою як шлях постсептичної адаптації. Тези доповідей міжнародної науково-практичної конференції молодих учених, аспірантів і докторантів “Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті” 16-17 травня 2013 р. м. Біла Церква. С. 7.

6. Мацкевич В.В. Диба Р.Д., Філіпова Л.М. Особливості введення *in vitro* *Agaranthus umbellatus*. *Новітні технології в рослинництві. Тези доповідей державної науково-практичної конференції* Біла Церква, 2013. С. 4.

7. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Сінельник О.О. Сумісне використання гіберелінів та цитокінінів у культурі тканин. *Актуальні проблеми озеленення населених місць: освіта, наука, виробництво, мистецтво формування ландшафту. Матеріали II Міжнародної наукової конференції 4-6 червня 2014 р.* м. Біла Церква. С. 69-70.

8. Filipova L, Matskevych V, Karpuk L, Andriievsky V, Vrublevsky A, Pavlichenko A Features of paulownia plants post-septic adaptation. *Abstract is a part of Multidisciplinary Conference for Young Researchers held in Bila Tserkva on 22nd November 2019 within the framework of the project Support of young university capacity in education and research and science activities in Ukraine (2019), financed by Czech Republic Development Cooperation*. P. 50-53.

9. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Деконтамінація експлантів агапантусу. “Аграрна наука — виробництву» «Новітні технології у рослинництві” Тези доповідей Державної науково-практичної конференції: листопад 2014 р. м. Біла Церква. С. 10.

10. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Застосування цитокінінів за мікроклонального розмноження ягідних культур. *Новітні технології в рослинництві. Тези доповідей державної науково-практичної конференції*

молодих вчених, аспірантів та докторантів 14-15 травня 2015 (БНАУ, м. Біла Церква). С. 8-9.

11. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Андрієвський В.В. Фотоавтотрофний метод мікроклонального розмноження ожини. *Сучасні агробіотехнології та землеустрій в Україні. Тези доповідей Державної науково-практичної конференції 19 листопада 2015 р.* (м. Біла Церква). С. 8-9.

12. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Гіпергідратація *in vitro* та її чинники. *Наукові пошуки молоді в третьому тисячолітті. Тези доповідей Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених, аспірантів і докторантів БНАУ, Біла Церква, 19–20 травня 2016 року.* С. 31.

13. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Вплив заліза на гіпергідратацію *in vitro* регенерантів ягідних культур. *Досягнення та перспективи генетики, селекції і рослинництва зернових культур.* Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН. 14-15 червня 2016. С. 121-122

14. Мацкевич В.В., Филиппова Л.Н. Особенности микроклонального размножения представителей рода *Actinidia*. *Технология органических веществ : Тезисы докладов 81-ой научно-технической конференции профессорско-преподавательского состава научных сотрудников и аспирантов (с международным участием), 1-12 февраля 2017 г.* Белорусский государственный технологический университет. Минск: БГТУ, 2017. С.34-35.

15. V. Andriyevskyy, V. Matskevych, L. Filipova Plant processing *in vitro* with lowered positive temperatures as a way of post-aseptic adaptation. *Тези доповідей: «Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті: матеріали міжнародної науково-практичної конференції молодих учених, аспірантів і докторантів».* м. Біла Церква, 18 та 23 травня 2017 р. Біла Церква, 2017. Ч. 1. С. 23-24

16. Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Протокол мікроклонального розмноження аличі, сливи, персика та підщепи персика. *«Актуальні проблеми озеленення населених місць: освіта, наука, виробництво, мистецтво*

формування ландшафту» *Тези доповідей учасників III Міжнародної науково-практичної конференції*. Біла Церква. 2017/5. С. 141-142.

17. Врублевський А.Т., Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Особливості боротьби із фенолоутворенням за введення ліщини *in vitro*. «Аграрна наука – виробництву». *Тези доповідей державної науково-практичної конференції*. М. Біла Церква, 17 листопада 2016 року. Біла Церква, 2016. Ч. 2. С. 65-67.

18. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Мацкевич О.В. Удосконалення технології мікроклонального розмноження *Prunus pérsica* на етапі введення в асептичну культуру. *Сучасні агробіотехнології та землеустрій в Україні. Матеріали державної науково-практичної конференції*. 23 листопада 2017 року. Біла Церква. 2017. С. 21-23.

19. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Розробка технології одержання кореневласних саджанців вітчизняних сортів персика *Сучасні проблеми ведення сільського господарства та підготовки фахівців аграрного профілю. Тези Міжнародної науково-практичної конференції* 15 лютого 2018, Біла Церква, БНАУ. С. 16-17.

20. Філіпова Л.М., Мацкевич В. В., Мацкевич О. В. Ризогенез павловнії *in vitro*. «Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту. Інноваційні технології в агрономії, агрохімії та екології. Землеустрій та кадастри у сучасних умовах: проблеми та вирішення». *Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції*. 27-28 вересня 2018 року. – Біла Церква, 2018. – С. 19-20.

21. Подгасецький А. А., Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., Кравченко Н. В. «Проблеми постасептичної адаптації рослин». *VII Международная научно-практическая конференция “Dynamics of the development of word Science»*. 18-20 марта 2020. Wankuwer, Kanada. С. 662-675.

22. Мацкевич В. В. Мікроклональне розмноження рослин: введення в культуру. *Гончарівські читання. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції* 25-26 травня 2020 р., Суми, Сумський національний аграрний університет. 2020. С. 31-32.

## ANNOTATION

Matskevich V.V. Microclonal propagation of plant species in vitro and their post-septic adaptation. Qualifying scientific work on the rights of the manuscript

The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of agricultural sciences on a specialty 06.01.05 - breeding and seed-growing". Sumy national agrarian university of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy, 2020.

Based on many years of research, the dissertation provides a theoretical generalization and a new solution to the current problem of agricultural production - the use of microclonal propagation of plant species in vitro to rid various infections: bacterial, fungal and viral, preservation in the state of juvenile taking into account the specific manifestation of their biological characteristics. adaptation.

The influence of different parts of organisms, their ontogenetic diversity, loss of integral and correlation connections during the introduction of plants into aseptic culture is proved. The example of dog rose and rose revealed the optimal engraftment of explants isolated from the "green cone" and no positive results were obtained using plants that were in deep dormancy. In actinidia, this was the apical part of the shoot, the western one - the shoot of the seedling.

Depending on the location of the infection, its type, biological characteristics of explants for decontamination should use different substances: "Linen" (1: 1) in combination with potassium permanganate, antibiotics (chloramphenicol 125 mg / l + gentamicin sulfate 80 mg / l), fungicides (Previcur Energy 840 SL, Maxim forte, Fundazol at a concentration of 3 ml / l), PPM biocide (2 ml / l).

A model for preventing the formation of phenol-like substances by regenerants has been developed. The possibility of somaclonal variability in in vitro culture was proved, which allowed to isolate a clone of Paulownia 112-3.

A special manifestation of in vitro juvenile thuja of western thuja was revealed. In paulownia, potatoes, chrysanthemums, carnations, hosts, ontogenetic diversity of plants in vitro depending on the origin of cuttings was revealed.

Methods for removing apical dominance for the cultivation period and increasing the reproduction rate in three host varieties have been identified.

Determination of in vitro ontogenesis in potatoes under the influence of changes in the composition of the nutrient medium, the action of low temperatures, modes and light spectrum.

The possibility of leveling apical dominance with the use of cytokinins has been proved: BAP (0.5 mg / l) against the background of IBA (0.25 mg / l). The phytotoxicity of BAP can be reduced by using gibberellins.

Measures have been developed to minimize the hyperhydration of test tubes. The effect of kinetins on potato tuber formation in vitro was revealed. When cultivating potatoes, on a medium with potato starch or tuber extract, instead of sucrose and agar, it had a positive effect on the development of the root system, stolons, reduced the period from grafting to tuber formation. In potatoes, blackberries had a positive effect on plant growth and development in vitro replacement of the negligent form of iron in Murasige and Skuga by Ferrileme 4.8 Orto-Orto.

Proven positive effect on rhizogenesis of hosts in vitro increase in the photoperiod from 8 to 16 hours. per day, as well as the replacement of IAA (1-5 mg / l) with IBA (1-5 mg / l). There was no significant difference in the manifestation of rooting in the host variety Patriot after the replacement of activated carbon (1.5 g / l) with wood (2.5 g / l).

It was found that hydrogels and perlite were the best substrates for engraftment of cuttings during postseptic adaptation of Podolyanka potato regenerators.

*Key words:* herbaceous crops, shrubs, trees, in vitro ontogenesis, explant, apical, medial, basal parts of the shoot, decontamination, sterilizing substances, Nutrient composition, phenol-like substances, somaclonal variability, juveniletion, apicaltermino dominance, light intensity, temperature, phytohormones, microbulbs, forms of iron, modified media, acidity of the environment, photoperiod, activated and ethereal coal, substrates.

## ЗМІСТ

Анотація	2
Перелік умовних позначень	19
Вступ	20
<b>РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ В НАСІННИЦТВІ РОСЛИН (огляд наукової літератури)</b>	<b>29</b>
1.1. Мікроклональне розмноження	29
1.2. Відмінність методів і техніки МКР залежно від технологічних, біологічних особливостей об'єктів	32
1.3. Перший етап МКР: вибір експланта, введення експланта його у культуру <i>in vitro</i> і первинне вирощування рослинних об'єктів	33
1.4. Особливості онтогенезу рослин <i>in vitro</i>	46
1.5. Детермінація онтогенезу в умовах <i>in vitro</i>	57
1.5.1. Гормональна детермінація онтогенезу	57
1.5.2. Трофічна детермінація онтогенезу регенерантів	67
1.6. Сомаклональна мінливість	74
1.7. Постасептична адаптація рослин <i>in vitro</i>	75
Висновки до розділу 1	82
<b>РОЗДІЛ 2. УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>84</b>
2.1. Місце проведення досліджень	84
2.2. Матеріал досліджень	86
2.3. Особливості деконтамінування	87
2.4. Мультиплікація	89
2.5. Індукція ризогенезу в регенерантів	90
2.6. Фотоавтотрофне мікроклональне розмноження	90
2.7. Постасептична адаптація	92
Висновки до розділу 2	93

РОЗДІЛ 3. ВІДБІР ТА ВВЕДЕННЯ ЕКСПЛАНТІВ В АСЕПТИЧНІ УМОВИ	95
3.1. Приживлення експлантів залежно від їх походження	95
3.2. Деконтамінація	105
3.3. Утворення регенерантами фенолоподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від умов та виду рослини	130
3.4. Сомаклональна мінливість	141
Висновки до розділу 3	144
РОЗДІЛ 4. ЮВЕНІЛІЗАЦІЯ <i>IN VITRO</i>	147
4.1. Зміна форм фотосинтезуючих органів туї в умовах <i>in vitro</i> та <i>ex vitro</i>	147
4.2. Гетеротрофне живлення і ювенілізація	150
4.3. Аерація і особливості міксотрофного живлення	157
4.4. Вплив екзогенних вуглеводів на утворення запасуючих органів	160
4.5. Вплив умов культивування <i>in vitro</i> на фоліогенез регенерантів хости	161
Висновки до розділу 4	167
РОЗДІЛ 5. РІЗНОЯКІСНІСТЬ РОСЛИН <i>IN VITRO</i>	169
5.1. Онтогенетична різноякісність	169
5.2. Вплив способів живцювання та кількості субкультивувань на регенерацію рослин хости з експлантів	181
5.3. Вплив віку материнських рослин-донорів експлантів на розвиток регенерантів туї західної	185
5.4. Різноякісність розсади агапнтусу <i>in vitro</i> залежно від періоду її культивування	186
Висновки до розділу 5	188
РОЗДІЛ 6. ДЕТЕРМІНАЦІЯ ОНТОГЕНЕЗУ РЕГЕНЕРАНТІВ ПІД ЧАС МКР	190



6.1.	Синергізм трофічних та фізичних детермінант МКР	190
6.2.	Фітогормональна детермінація	206
6.2.1.	Застосування цитокинінів за мікроклонального розмноження ягідних культур	206
6.2.2.	Застосування цитокинінів за МКР енергетичної верби	211
6.2.3.	Реакція павловнії <i>in vitro</i> на цитокиніни	216
6.2.4.	Детермінація онтогенезу етермінація онтогенезу ківі <i>in vitro</i> цитокинінами	225
6.2.5.	Гібереліни	230
6.3.	Вплив цитокиніну, етилену та кислотності живильного середовища на гіпергідратацію регенерантів	238
6.4.	Особливості детермінації онтогенезу регенерантів картоплі біологічно активними речовинами	243
6.5.	Трофічна детермінація онтогенезу регенерантів	262
6.6.	Особливості використання заліза в штучних живильних середовищах	278
6.7.	Особливості онтогенезу рослин картоплі на модифікованому в лабораторії біотехнології БНАУ штучному живильному середовищі	286
6.8.	Вплив кислотності живильного середовища на онтогенез регенерантів	288
	Висновки до розділу 6	292
<b>РОЗДІЛ 7. ПОСТАСЕПТИЧНА АДАПТАЦІЯ РОСЛИН IN VITRO</b>		<b>297</b>
7.1.	Трофічна та гормональна детермінація ризогенезу <i>in vitro</i> в регенерантів хости	297
7.2.	Захист від шкідливої мікрофлори субстрату під час висадки розсади хости <i>ex vitro</i>	305
7.3.	Особливості постасептичної адаптації павловнії	307

7.4.	Постасептина адаптація картоплі	333
7.5.	Вплив субстрату на постасептичну адаптацію регенерантів <i>in vitro</i> <i>Thuja occidentalis 'Smaragd'</i>	339
7.6.	Введення регенерантів <i>in vitro</i> у стан спокою як шлях постасептичної адаптації	342
7.7.	Постасептична адаптація представників роду Актинідія	349
7.8.	Фотоавтотрофний метод МКР як одночасне розмноження і постасептична адаптація	354
	Висновки до розділу 7	366

## РОЗДІЛ 8. ПРОТОКОЛИ УДОСКОНАЛЕНИХ ТЕХНОЛОГІЙ МКР ТА ПОСТАСЕПТИЧНОЇ АДАПТАЦІЇ

		371
8.1.	Хоста	371
8.2.	Агапантус ( <i>Agapanthus umbellatus</i> )	379
8.3.	Туя західна	381
8.4.	Картопля	382
8.5.	Малина	387
8.6.	Ожина	392
8.7.	Актинідія	396
8.8.	Алича, слива, персик, підщепи персика	400
8.9.	Павловнія	405
	ВИСНОВКИ	415
	РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ ПРАКТИЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ	426
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	432
	ДОДАТКИ	471

### Перелік умовних позначень

- АБК** – абсцизова кислота
- а.в.** – активоване вугілля
- БАП** – бензиламінопурин
- ГК** – гіберелова кислота, гіберелін
- ІОК** – індолілоцтова кислота
- НОК** – нафтилоцтова кислота
- ІМК** – індолілмасляна кислота
- МКР** – МКР рослин, в умовах *in vitro* з мікогетеротрофним живленням
- НОК** – нафтилоцтова кислота
- ПВП** – полівінілпіролідон
- ФАМКР** - фотоавтотрофний метод МКР.
- QL** – середовище за прописом Куаріна і Лепувра
- MS** – середовище за прописом Мурасіге і Скуга
- MS<sub>1/2</sub>** – середовище за прописом Мурасіге і Скуга із половинним набором мінеральних елементів
- Ex vitro*** – перше постасептичне вирощування рослин *in vitro*
- In vivo*** – вирощування матеріалу у природних умовах
- PPM™** – біоцид (Plant Preservative Mixture™)

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Тотипотентність рослинних клітин, тканин і органів обумовлює успішне застосування мікроклонального розмноження рослин. Однак на етапах введення в асептичні умови, мультиплікації, ризогенезу й постасептичної адаптації існують постійні фізіологічні й технологічні проблеми, що і вимагає системного аналізу цього технологічного процесу [98, 277]. Зокрема, на першому етапі, що передбачає відбір донорів та отримання стерильної культури, важливими є деконтамінація експлантів та застосування заходів, пов'язаних з адаптацією рослинних об'єктів до умов *in vitro*. На другому етапі – власне прискореного розмноження, щоб досягти максимально високих коефіцієнтів мультиплікації впродовж тривалого часу без втрат якостей матеріалу, що розмножується. Під час третього етапу – технологічно підготовлюють рослини *in vitro* для успішного розмноження *in vivo*. Четвертий етап передбачає пересадку рослин у ґрунт, використовуючи всі можливі способи підвищення адаптивної здатності рослин у постасептичний період. Потребують удосконалення прийоми переходу із мікогетеротрофних до автотрофних умов живлення та адаптації асептичного матеріалу до нативних умов.

Отже, актуальним є системне дослідження особливостей етапів мікроклонального розмноження біологічно різних, зокрема інтродукованих в Україну, видів рослин з подальшою розробкою насінницько-технологічного комплексу для їх успішного поширення.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** В основу дисертації покладено експериментальні дані науково-дослідної роботи автора, що виконувалась упродовж 2005–2016 рр. і була складовою частиною тематики досліджень кафедри лісівництва, ботаніки і фізіології рослин в 2013–2017 рр. «Удосконалення існуючих та розробка нових методів клонального мікророзмноження та постасептичної адаптації рослин *in vitro* (номер державної реєстрації 0199U000736), «Фізіологічні основи постасептичної адаптації деревних рослин» на 2017–2021 рр. (номер державної реєстрації 0117U004672),

«Удосконалення існуючих та розробка нових технологічних прийомів мікроклонального розмноження горіхоплідних культур» на 2017–2021 рр. (номер державної реєстрації 0117U004673).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було визначення фізіолого-біохімічних, анатоμο-морфологічних особливостей, які проявились у процесі культивування *in vitro*, та розроблення теоретико-експериментального обґрунтування оптимізації технологічного процесу культивування видів рослин *in vitro, ex vitro*.

Для реалізації поставленої мети заплановано вирішити **завдання** за етапами технологічного процесу, а саме:

Перший етап – на основі емпіричних досліджень розробити ефективні прийоми деконтамінації первинних експлантів з урахуванням вікових, анатомічних, видових особливостей рослин та видового різномаяття контамінуючої мікрофлори; обґрунтувати теоретичні основи первинного культивування та адаптації біологічних об'єктів до умов *in vitro*.

Другий етап – підібрати детермінанти для тривалої і стабільної мультиплікації видів рослин.

Третій етап – теоретико-експериментально обґрунтувати підходи гормональної та трофічної регуляції ризогенезу, розвитку вегетативної частини, запасуючих органів.

Четвертий етап – удосконалити наявні та розробити нові методи постасептичної адаптації.

Щоб вирішити вказані завдання застосовано наступні підходи:

- 1) *узагальнюючі* – через систематизацію результатів попередніх досліджень та власного експериментального матеріалу;
- 2) *наукові* – пізнання фізіології онтогенезу рослин *in vitro* за етапами мікроклонального розмноження та їх постасептичної адаптації;
- 3) *організаційні* – щодо застосування фітодетермінантів у біотехнологічному процесі та розроблення технологічних протоколів мультиплікації й адаптації рослин *in vitro*.

*Об'єкт дослідження* – технології мікрклонального розмноження і адаптації рослин *in vivo*.

*Предмет дослідження* – фізіолого-біохімічні, анатомо-морфологічні особливості процесів у видах рослин, що відбуваються за мікрклонального розмноження та постасептичної адаптації з метою інтенсифікації насінницького процесу.

*Методи досліджень:*

- лабораторний – культивування рослин в асептичних умовах;
- вегетаційний – закладання дослідів у суворо контрольованих умовах з метою поглибленої оптимізації процесів адаптації;
- систематизація підходу в кількісній і якісній оцінці регенераційних, ростових та адаптаційних процесів рослин в асептичних і нативних умовах;
- фізіолого-технологічний – розроблення протоколів складових етапів біотехнологій мультиплікації і адаптації рослин *in vitro*;
- розрахунковий – визначення якісних та кількісних показників регенерації рослин для підвищення ефективності їх насінництва;
- математично-статистичний аналіз для обґрунтування кількісної оцінки отриманих експериментальних даних.

**Наукова новизна одержаних результатів** полягає у теоретичному обґрунтуванні та новому вирішенні актуальної проблеми: специфічності прояву інтегральних та кореляційних зв'язків між окремими органами рослин *in vivo*, *in vitro*, *ex vitro* через дослідження фізіолого-біохімічних, анатомо-морфологічних особливостей на кожному з етапів мікрклонального розмноження численних, систематично різноякісних ботанічних видів рослин, включаючи введення експлантів у асептичні умови, ювенілізації та онтогенетичної різноякісності рослин *in vitro*, детермінації онтогенезу регенерантів і постасептичної адаптації.

*Вперше в Україні:*

- з урахуванням біологічної специфічності культур, які вводились *in vitro*, розроблено методичні підходи застосування як деконтамінантів

біоциду PPM – PlantPreservativeMixture™ (5-Chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolone 0,1350 % і 2-methyl-3(2H)-isothiazolone 0,0412 %) та Бланідас 300 (натрієва сіль дихлорціануронової кислоти 80,52 %);

- розроблено комплексний підхід деконтамінації регенерантів залежно від місця та типу контамінації, виду рослин, включаючи їх здатність протистояти некротизації тканин;

- відпрацьовано комплекс заходів коригування забезпеченості рослин *in vitro* регуляторами росту, включаючи їх наявність у донорів та специфічність реакції видів рослин на їх співвідношення;

- на підставі експериментальних даних вперше запропоновано гіпотезу про детермінуючий вплив на ювенілізацію різних типів живлення, включаючи гетеротрофне, рівня аерації, наявності в живильному середовищі гормонів;

- науково обґрунтовано підходи керування утворенням у регенерантів фенолоподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від біологічних особливостей видів рослин, складу живильного середовища, використання пересадок, площі раневої поверхні, спеціальної підготовки експлантів;

- розроблено підходи для керування онтогенезом рослин *in vitro*, включаючи тривалість фотоперіоду, спектр світла, температурний режим, співвідношення регуляторів росту, забезпеченість речовинами для автотрофного живлення;

- підтверджено зв'язок ювенілізації рослин *in vitro* зі зміною прояву морфологічних ознак, зокрема фотосинтезуючих органів;

- досліджено процес гіпергідратації в рослин *in vitro*, створено модель причин її виникнення залежно від біологічних особливостей рослин та регулювання процесу зміною концентрації цитокинінів, етилену та кислотності живильного середовища;

- для окремих видів рослин апробовано використання, як гелеутворювачів, джерел автотрофного живлення картопляного крохмалю та картопляного екстракту замість агару, сахарози;

- для трьох культур: картоплі, хости і павловнії розроблено метод постасептичної адаптації шляхом введення рослин *in vitro* в стан спокою. У картоплі таким органом виявились мікробульби, включаючи одержані методом «культури одного вузла», а в павловнії це досягалось зниженням вологості з 70–75 % до 30–35 % і температури з 22–24 °С до 6–8 °С впродовж 60 діб;

- на прикладі фундука обґрунтовано застосування фотоавтотрофного методу мікроклонального розмноження;

- доведено ефективність заміни хелатної форми заліза в середовищі Мурасіге і Скуга на добриво Ferrilene 4.8 Orto – Orto, що в процесі вирощування ожини знизило частку хлоротичних, вітрифікованих рослин та збільшило кількість пагонів у конгломераті, а в сортів картоплі збільшило висоту рослин, довжину кореневої системи, прискорило початок утворення столонів та бульб.

*Набули подальшого розвитку:*

- положення про соматоклональну мінливість експлантів, індуковану утворенням травматичного калюсу та екзогенними гормонами, що проявилось через зміну забарвлення листків, їх морфології;

- вплив на онтогенетичну різноякісність рослин *in vitro* павловнії, картоплі, хризантеми, гвоздики, хости походження живців. Перевагу мали регенеранти з апікальної, медіальної частини стебла, порівнюючи з базальною. Після 4–5 живцювання різниця експлантів від перших двох нівелювалась;

- положення про можливість зниження фітотоксичності цитокініну БАП, через додавання в живильне середовище гібереліну (2,5 мг/л), що дозволило збільшити висоту регенерантів павловнії на 24 см, або в 1,6 раз, та знизити кількість вітрифікованих рослин на 52 %. У деревовидних видів:



падуб, цитофортунелла оптимальним виявилось поєднання БАП та гібереліну по 2,5 мг/л.

**Практичне значення одержаних результатів.** Зроблено внесок у технології МКР 6 трав'янистих, 5 чагарникових та 12 деревних видів рослин, а для хости, агапантуса, туї західної, картоплі, малини, ожини, актинідії, аличі, сливи, персика та його підщеп, павловнії розроблені протоколи МКР та постасептичної адаптації.

Доведено перспективність використання гібереліну для обробки материнських рослин та пагонів рослин-донорів для виходу з глибокого спокою. Для хости, троянди, ожини, павловнії оптимальна концентрація розчину становить 0,01–0,1 %.

Виявлено, що краще приживлення експлантів актинідії, менш інтенсивне фенолоутворення відбувається влітку, а в павловнії – наприкінці грудня–початку січня.

Для захисту від внутрішнього контамінування рекомендовано додавати у живильне середовище термостабільні антибіотики: левоміцетин (250 мг/л), чи гентаміцин сульфат (160 мг/л). Кращим варіантом було їх поєднання (125 і 80 мг/л).

Зменшення фенолоутворення та покращення приживлення експлантів можна досягти їх зануренням у антиоксидантні розчини (перші 60 хв. аскорбінова кислота, 200 мг/л + цистеїн, 5 мг/л та наступні 60 хв. – розчин полівінілпіролідон, 10 г/л).

Доведено перевагу за приживленням експлантів агапантуса, висотою пагону та їх кількості в кущі використання рослин-донорів 90 – добового віку, проти 30 і 45 добового. У туї західної це стосувалось донорів-живців віком 60 діб, проти 20.

Максимальну кількість пагонів у конгломераті павловнії можна досягти за концентрації в середовищі БАП 1,5 мг/л, у розетці смородини – 1,0 мг/л препарату, а малини – 0,5 мг/л на фоні 0,25 мг/л ІМК.

Обґрунтовано вплив цитокінінів на бульбоутворення *in vitro* картоплі. Максимальний вихід мікробульб (162–171 % проти 71 % у контролі) спостерігався у варіантах з аденіном (20 або 25 мг/л) та поєднання аденіну (20 мг/л) з кінетином (1 мг/л) за культивування в темноті. На середовищі з 20 мг/л аденіну мала місце найнижча вітрифікація рослин: 1,1 % проти 1,4 в контролі.

Виявлено, що заміна в середовищі для регенерації хости ІОК (у межах 1-5 мг/л) на ІМК (1–5 мг/л) прискорила коренеутворення в крайніх варіантів сорту Патріот у 2,1–3,1 раза, а Паульс Глорі – 1,6–2,3. Зі зростанням концентрації ІМК збільшувалась довжина коренів за оптимальної у варіанті з концентрацією 4,0 мг/л, а також кількість коренів з найвищим проявом показника за концентрації 2,0 мг/л.

Розроблено положення про можливість заміни активованого вугілля на деревне, що позитивно вплинуло на збільшення довжини коренів у сорту хости Патріот з 14,3 до 37,3 мм, а в сорту Паульс Глорі, відповідно, з 7,7 до 38,9 мм, що не спостерігалось щодо кількості коренів, коли різниця між варіантами, залежно від концентрації ІМК, виявилась неістотною.

Виявлено вплив кислотності живильного середовища на онтогенез регенерантів. Підвищення її до рН 4,0 у смородини чорної спричиняло симптоми дефіциту магнію, фосфору та калію. За рН 7,0 на нижніх листках відмічено ознаки нестачі азоту, а на верхніх – заліза. У агапантуса рН 4,0 спричиняло вітрифікацію регенерантів за першого пасажу у 43 % регенерантів, а за третього – 92 %.

Матеріали дисертаційної роботи апробовано під час читання курсів «Фізіологія рослин», «Основи біотехнології рослин», у Білоцерківському національному аграрному університеті, а також впроваджено в навчальний процес інших навчальних закладів України.

Практичне значення і ефективність розробки протоколів удосконалення технологій мікроклонального розмноження знайшло підтвердження в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України

(додаток А), Інституті картоплярства НААН України (додаток Б), Білоцерківському національному аграрному університеті (додаток В), ТОВ “Колосія”, Закарпатської області (додаток Г), ФГ “Ягідне МС” Вінницької області (додаток Д), ФГ Беррі Фарм Юкрейн Волинської області (додаток Ж).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом особисто розроблено концепцію, програму досліджень, сформульовано мету та основні завдання робіт. Самостійно виконано лабораторні, вегетаційні дослідження та проведено статистичну обробку одержаних експериментальних даних.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи доповідали і обговорювали на: щорічно на засіданні кафедри лісового господарства та міжкафедральної лабораторії біотехнології рослин Білоцерківського національного аграрного університету та розширеному засіданні (2020); розширеному засіданні кафедри біотехнології та фітофармакології Сумського національного аграрного університету (2020); Научной конференции, посвященной 35-летию со дня организации РУП «Институт защиты растений» НАН Беларуси (Минск, 2006); VI Державній науково-практичній конференції (Біла Церква, 2007); міжнародній науково-практичній конференції “Інноваційні агротехнології в умовах глобального потепління (Мелітополь–Кирилівка, 2009); III Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология, как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира» (Волгоград, 2010); III Международной Интернет-конференции «Инновационные фундаментальные и прикладные исследования в области химии сельскохозяйственному производству» (Орел, 2010); міжнародній науковій конференції, присвяченій 135-річчю заснування Херсонського державного аграрного університету «Онтогенез – стан, проблеми та перспективи вивчення рослин в культурних та природних ценозах» (Херсон, 2010); Державній науково-практичній конференції: “Новітні технології в рослинництві” (Біла Церква, 2012); науково-практичній конференції молодих учених, аспірантів і докторантів: “Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті” 16–17 травня 2013 р. (м. Біла Церква);

Державній науково-практичній конференції “Аграрна наука – виробництву. Новітні технології у рослинництві” (Біла Церква, 2013); II Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми озеленення населених місць: освіта, наука, виробництво, мистецтво формування ландшафту (Біла Церква, 2014); Державній науково-практичній конференції молодих учених, аспірантів та докторантів: «Новітні технології в рослинництві» (Біла Церква, 2015); міжнародній науково-практичній конференції молодих учених, аспірантів і докторантів «Наукові пошуки молоді у третьому тисячолітті» (Біла Церква, 2016); міжнародній науково-практичній конференції: "Досягнення та перспективи генетики, селекції і рослинництва зернових культур" (Миронівка, 2016); 81-ой научно-технической конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов: «Технология органических веществ» (Минск, 2017); международной научно-практической конференции “Dynamics of the development of word Science» 18–20 марта 2020.Wankuwer, Kanada; міжнародній науково-практичній конференції «Гончарівські читання». 25-26 травня 2020 р.

**Публікації.** Основні положення дисертації висвітлено в 59 публікаціях, з них: одна монографія, один підручник, 31 стаття, у тому числі 25 у фахових виданнях із сільськогосподарських наук України та шість закордонних; 22 – тез доповідей на наукових конференціях і з’їздах, два навчальні посібники, два – науково-практичні посібники.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота містить анотацію українською та англійською мовами, зміст, перелік умовних позначень, вісім розділів, висновки, рекомендації для виробництва, список використаної літератури, який нараховує 344 посилання, в тому числі 84 латиницею, додатки. Дисертацію викладено на 478 сторінках машинописного тексту комп’ютерного набору, у тому числі 402 сторінках основного тексту. Вона ілюстрована 128 таблицями та 155 рисунками.

## РОЗДІЛ 1

### БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ В НАСІННИЦТВІ РОСЛИН (огляд наукової літератури)

#### 1.1. Мікроклональне розмноження

Біотехнологічні методи в насінництві, розсадництві – один з найбільш перспективних сучасних напрямів сільськогосподарського, декоративного і лісового виробництва. Розмноження рослин *in vitro*, оздоровлення їх від патогенних мікроорганізмів, зокрема, вірусів, створення генетично змінених форм рослин, формування банків сортів і видів рослин та їх збереження і підтримування *in vitro* – це реальні здобутки біотехнології рослин, які щорічно збільшують масштаби її застосування.

Удосконалення методів прискореного розмноження видів рослин завжди було актуальним, а тому дослідження в цьому напрямі продовжуються і донині. Основою для їх проведення було прагнення мати якомога більшу кількість ідентичних рослин клону, який виділився за комплексом агрономічних ознак. Найчастіше для швидкого розмноження рослин використовують їх частини, які мають точку росту. Водночас, без застосування цих методів в насінництві, розсадництві, не можна досягти високих результатів з розмноження рослин. Наприклад, за вегетативного розмноження картоплі методами відділення паростків, розмноження відводками, стебловими живцями, вкорінення верхівок та пазушних пагонів, розмноження паростковими живцями можна отримати з однієї рослини за рік до 700 нових, а при поєднанні методів до 8 000 [42].

Використовуючи умови *in vitro*, можна досягти коефіцієнту розмноження міскантусу за рік 1: 1 000 000 [201], цукрових буряків за шість місяців 1: 5 000 [199], картоплі за 8-10 місяців 1: 20 000 [105], що не може бути досягнуто застосуванням будь-яких інших методів.

Переваги, які має прискорене розмноження рослин *in vitro*, полягають у наступному: 1. Накопичення садивного матеріалу у рослин, що мають низький коефіцієнт розмноження, високо цінних або рідкісних у природному

середовищі, 2. Підтримання генотипів, що характеризуються генетичною нестерильністю, 3. Зберігання в штучних умовах видів, для яких складаються вкрай несприятливі зовнішні умови вирощування, тобто вони перебувають на межі зникнення, 4. Підтримання і зберігання колекційних зразків [151]. 5. Швидке збільшення площ, зайнятих новими сортами, гібридами. 6. Накопичення садивного матеріалу впродовж року і планування необхідного його обсягу до певного строку, 7. Отримання великої кількості матеріалу на малій лабораторній площі, 8. Переривання періоду спокою органів рослин.

Клонування в традиційному значенні – це отримання матеріалу, ідентичного вихідній формі за вегетативного розмноження. Ця особливість методу набула широкого застосування на практиці. Для окремих видів рослин: картопля, топінамбур, суниця та багатьох інших, цей спосіб домінуючий у насінництві. Водночас, морфологічна відмінність між рослинами в полі, наявність латентної інфекції ставлять особливі вимоги до відбору матеріалу для клонування.

Більшість вітчизняних учених використання біотехнологічного методу під час розмноження рослин називають мікроклональним розмноженням (МКР) [98, 151, 199], проте нерідко зустрічається термін «клональне мікророзмноження» [105, 60, 200, 201]. За кордоном поширені терміни «Micropropagation plants - мікророзмноження рослин» [322] та «Plant tissue culture – культура рослинних тканин» [333].

Зважаючи на те, що на відміну від застосування клонів для вегетативного розмноження, де використовуються великі частини рослин і репродукування їх відбувається в умовах *in vivo*, в терміні «мікроклональне розмноження» акцентується увага на те, що це клони з мінімальним розміром його складових. А тому, вважаємо, що термін «мікроклональне розмноження» має більше підстав для використання.

Мікроклональне розмноження (МКР) рослин – це спосіб вегетативного розмноження рослин, основу якого становить прискорене отримання

численних генетично ідентичних форм з використанням біотехнологічних методів.

Незважаючи на тривалі і результативні дослідження стосовно МКР в Україні і за кордоном, реалізація основних завдань, які ставились перед початком робіт у цьому напрямі, окремі проблеми і донині залишаються не вирішеними. Перш за все це стосується енергозбереження за МКР і підвищення технологічності та адаптивності матеріалу на етапі *in vitro* – *in vivo*.

Цінність МКР у можливості поєднання з іншими методами, наприклад, з оздоровленням рослин від інфекції, зокрема, вірусної, позбутися якої іншими методами дотепер не вдавалося, а втрати врожаю від її поширення надзвичайно великі. Стерильність культури *in vitro* дає змогу використовувати пробірковий матеріал для інших біотехнологічних, генетичних, фізіологічних досліджень тощо.

Крім загальних біотехнологічних вимог успіх, МКР залежить від специфічних: фізіолого-біохімічного стану експланта, складу живильного середовища, умов культивування [199].

Морфогенез *in vitro*, який є складовою МКР, настільки науково відпрацьований, що набув надзвичайно широкого практичного застосування, тобто його використання вийшло за межі наукових лабораторій. Водночас, науковий пошук не має права зупинитись на досягнутому, а тому стосовно МКР удосконалюються технології, досліджуються нові підходи для більш ефективного практичного використання методу тощо. Яскравим прикладом викладеного може бути результативність пошуку у напрямі застосування біотехнологічного методу в насінництві картоплі. На першому етапі оздоровлений і розмножений матеріал для переходу *in vitro* - *in vivo* висаджували розсадним методом. Через певний час виявлена можливість утворення в пробірковій культурі мікробульб, які можна успішно вирощувати безпосередньо *in vivo*. У подальшому розроблені гідропонні, аеропонні технології для отримання садивного матеріалу і, нарешті, сучасна технологія

швидкого розмноження оздоровленого матеріалу [74, 122]. Проте, ми вважаємо, що на цьому вдосконалення біотехнологічного методу в насінництві картоплі не зупиниться, а матиме продовження.

У дисертаційній роботі зроблено спробу узагальнити особливості, в основному морфо-фізіологічні, за МКР окремих видів рослин з висвітленням специфіки процесу, включаючи адаптаційні процеси, які мають місце на етапі *in vitro* – *ex vitro* – *in vivo*.

## **1.2. Відмінність методів і техніки МКР залежно від технологічних, біологічних особливостей об'єктів**

Залежно від потреб виробництва та спеціалізації лабораторій застосовуються різні методи розмноження в асептичних умовах. МКР і вибір оптимальної моделі культивування *in vitro* тісно пов'язані з біологічними особливостями виду. Комплекс чинників, кожний із яких окремо, і в поєднанні із іншими, впливає на розвиток регенерантів *in vitro*. Серед них найбільш важливими є тип експланта, генотип рослини, умови культивування донорських рослин, особливості складу штучних живильних середовищ, фотоперіод та інші.

До останнього часу не існує єдиної класифікації методів МКР. Найбільш визнаним є трактування Н.В. Катаєвої, Р.Г. Бутенко, [75], які пропонують дві групи методів. До першої відносять ті з них, які передбачають активацію вже існуючих у рослині меристем (апекс, пазушні та сплячі бруньки). Наприклад, у разі живцювання пагона, з бруньки, що знаходиться в пазусі листка, відростає новий пагін та утворюється коріння і, таким чином, регенерується нова рослина. Друга група – це індукція утворення бруньок або ембріодів *de novo*, що може відбуватись трьома шляхами: *а* – утворенням організованих структур безпосередньо із спеціалізованих тканин експланта: тканин репродуктивних органів, епідермісу, субепідермальних тканин, мезофілу листа; *б* – через одержання первинного калюсу з клітин експланта; *в* – з



використанням пересадочної калюсної тканини або клітин, що ростуть у суспензійній культурі.

Основною відмінністю цих груп методів, на яку звертають увагу у першу чергу на виробництві, є різниця між рослинами, що регенеруються з меристем, а саме: а) рослини є генетично ідентичними батьківським формам (перша група методів); б) рослини утворені зі спеціалізованих і калюсних клітин, в яких є певна ймовірність зміни генетичної інформації. Перша група методів використовується для прискореного розмноження в насінництві, розсадництві, друга – переважно в селекційних цілях.

Морфогенез *in vitro* має такі етапи. Перший – відбір, підготовка донорів експлантів та отримання стерильної культури. Деякі автори введення в асептичні умови виділяють в окремий етап, наприклад етап 0 [277]. Другий – прискорене розмноження *in vitro*. Третій – індукція ризогенезу. Ці етапи характеризуються не лише зміною методичних підходів у процесі культивування, але й різними вимогами до навколишнього середовища. У сучасних дослідженнях ще виділяють етап 4, на якому пробіркові рослини переносять з умов *in vitro* для вирощування в ґрунт [98], тобто при цьому вони повинні пройти постасептичну адаптацію. Рослини, які з асептичних умов (*in vitro*) перенесені в нестерильні умови (*in vivo*) називають «рослини *ex vitro*».

### **1.3. Перший етап МКР: вибір експланта, введення його культуру *in vitro* і первинне вирощування рослинних об'єктів**

***Відбір вихідного матеріалу для введення в культуру *in vitro*.*** Успіх МКР не можливий без отримання стерильного матеріалу. Від проходження цього етапу залежить чи буде залучений рослинний об'єкт в селекційний і (або) насінницький процес з використанням культури тканини, тому для введення в асептичну культуру обраного виду із умов *in vivo* обов'язковою є стерилізація первинних експлантів. Це пов'язано з тим, що поверхневі покриви органів рослин контаміновані різноманітними грибами, бактеріями.

Крім того, під час вирощування на штучному живильному середовищі вони в результаті своєї життєдіяльності поглинають з нього поживні речовини і натомість виділяють токсини, які, накопичуючись у середовищі, гальмують біологічні процеси в рослинних клітинах і за тривалого впливу призводять до їх загибелі [75].

Найчастіше інфіковані грибами, бактеріями культури досить легко визначаються макроскопічно і можуть бути вибракованими за ознаками помутніння середовища. Проте, можливі випадки інфікування рослинних тканин деякими видами бактерій, які не викликають змін середовища, а також деструкції тканин. Це, зокрема, коринебактерії, мікрококи і бацили [308]. Контамінанти можуть за перших пасажів не завжди проявлятися. Наприклад, в експлантів вишні та черешні відмічено появу мікрофлори після четвертого пасажу. Зокрема бактеріальна популяція за даними ПЛР методу містила 32 клони, що належали до наступних родів: *Acinetobacter*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* (у черешні) та *Burkholderia*, *Escherichia*, *Stenotrophomonas*, *Wautersia* (у вишні). Джерелом зараження рослин *in vitro* була ризосферна, епіфітна й ендоефітна мікрофлора та хвороботворна мікрофлора людини [7].

Для усунення інфекції застосовують деконтамінацію, тобто знищення патогенної епіфітної та ендоефітної мікрофлори. Як правило, внутрішні тканини здорових рослин можна вважати стерильними. Наприклад, зазвичай, меристеми рослин картоплі є вільними від контамінантів. Часто достатньо лише простерилізувати поверхневу тканину і можна отримати асептичні експланти [154]. Однією з причин відсутності забруднення цієї тканини є слаборозвинені провідні пучки які не доходять до меристематичного куполу та вузькі плазмодесми. Ці перепони в більшості випадків не пропускають, навіть, найдрібніших мікроорганізмів – вірусів [156]. А щільно розташовані покривні листки слугують своєрідним бар'єром між меристемою та оточуючим середовищем.

Вважається, що легше стерилізуються біологічні об'єкти, які мають покривні тканини без опушення та шорсткості, наприклад, насіння. Водночас,

деконтамінацію такого матеріалу слід проводити до намочування в стерильній воді. У протилежному випадку частка інфікованих експлантів може становити 80% [184].

Однак, внутрішні тканини здорових рослин, вважаючись стерильними, можуть мати непатогенні бактерії, що не завжди виявляються [72]. Наприклад, широко застосовуються технології одночасного вирощування мікроорганізмів із рослинами, зокрема, картопля і бактерії роду *Pseudomonas*, [82], чи деревні рослини і мікоризні гриби [46].

Основною умовою успішного асептичного культивування є стерилізація внутрішніх тканин без їх пошкодження. Ефективність процесу ( $E_1$ ) визначають [212] за кількістю неінфікованих експлантів після стерилізації ( $c$ ) у відсотках до вихідної кількості експлантів, що стерилізувались ( $s$ ):

$$E_1 = \frac{c}{s} \times 100\%$$

Вплив стерилізуючої речовини залежить від її виду, концентрації, підготовки експлантів та експозиції. Крім цього, успішний перебіг процесу залежить від щільності та чутливості тканини, що контактують із антисептиком. Вдалий вибір стерилізуючого агента полягає в тому, щоб він був дуже активним стосовно всіх мікроорганізмів і, водночас, найменше пошкоджував тканини рослини.

Труднощі, пов'язані із цією проблемою, особливо проявляються в об'єктів, що мають пошкодження та інші шляхи проникнення антисептика глибше покривних тканин, органів. У таких випадках відбувається пригнічення експланта аж до відмирання тканин, які менш стійкі до впливу активних агентів, ніж покривні.

Можливі випадки коли покривні тканини відмирають, а морфогенез експлантів відбувається за рахунок неушкоджених внутрішніх тканин, що не контактували з антисептиком. Типовими пошкодженнями є також травми під час відокремлення експлантів від материнської рослини. У цих випадках

антисептик може поглинатись і рухатись як по міжклітинниках, так і дальнім транспортом по елементах провідних пучків. Важливою умовою успішного проходження стерилізації є легке видалення з експланта активного агента шляхом промивання його стерильною (найчастіше автоклавованою) водою або він повинен легко розкладатися як це відбувається у випадку стерилізації перекисом водню [98].

Передує стерилізації звільнення експланту від бруду. Для цього зазвичай, використовують пральні засоби, або ж опускають в спирт.

**Типи деконтамінантів.** Незважаючи, на те, що методи асептичного вирощування рослин були розроблені ще в першій половині минулого століття, найбільш поширеною у наш час залишається хімічна стерилізація рідкими, рідше газоподібними речовинами, хоча є розробки із використанням фізичного впливу на мікроорганізми, наприклад обробка ультразвуком [212]. Для досягнення асептичності експлантів, найчастіше використовують сполуки, які містять активний хлор (гіпохлорит натрію або кальцію, хлорамін, хлорне вапно, ртуть (сулема, етанолмеркурхлорид, тімеросал, діюцид) кисень (перекись водню), срібло ( $\text{AgNO}_3$ ) спирти (етиловий, ізопропіловий), або суміш декількох активних речовин та кислоти. У деяких випадках і, особливо, коли інфекція міститься не тільки на поверхні експланта, а існує ймовірність глибокої контамінації, застосовують фунгіциди [236] та антибіотики [303]. Наприклад, коли за введення зародків *Castanea sativa* Mill. під час проростання проростка відбувається вихід грибової інфекції з ендосперму [169].

Гіпохлорити. Застосовують солі гіпохлоритної кислоти, які стійкіші від самої кислоти і можуть існувати у вільному стані. Проте, використовуючи побутові препарати слід враховувати, що вони, все таки, розпадаються. Наприклад, водні розчини гіпохлориту натрію з часом розкладаються навіть за звичайної температури - 0,085 % за добу [167]. Найуживанішими з них є гіпохлорит натрію  $\text{NaClO}$  і гіпохлорит кальцію  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ . Останній являє собою основну частину, так званого, хлорного вапна. Антимікробна

активність цих препаратів пов'язана з утворенням у водних розчинах хлорноватистої кислоти, що також розкладається з утворенням хлору та кисню [167].

Широко використовується гіпохлорит натрію –  $\text{NaClO}$ . Його застосовують для деконтамінації різних експлантів у вигляді 0,5-5% розчинів з експозиціями від 1 до 20 хв., а інколи й більше, зокрема: насіння, пагонів, бруньок. Знайшла застосування також своєрідна модифікація гіпохлоритів – хлорокс, який є комерційний препарат 5,25% розчину гіпохлориту натрію в воді, що містить також сліди перманганату калію [175].

Незважаючи на широкий спектр застосування гіпохлориту натрію, стерилізація експлантів з його використанням має ряд проблем, зокрема, це незадовільні результати за глибокого контамінування експлантів грибною та бактеріальною мікрофлорою, а тому застосування його для стерилізації не завжди дає позитивні результати. Крім цього, високі концентрації препарату або тривалі експозиції призводять до токсикації рослинних тканини.

Хлорамін. Це розчинна в холодній воді неорганічна сполука, хлорпохідна аміаку, що розкладається за температури вище  $-40^{\circ}\text{C}$  (ГОСТ 42-21-2-85). Діє на рослинну тканину слабше ніж гіпохлорити кальцію й натрію. Хлорамін застосовував ще в минулому столітті Морель для стерилізації коренів кукурудзи [72]. Його також успішно використовують для деконтамінації експлантів гербери [147] та в медицині для стерилізації інструментів [40].

Ртутьвмісні препарати. Найчастіше це сулема та двохкомпонентний препарат діюцид. Наприклад, за введення *in vitro Cladrastis kentukea* успішно застосовано 0,1 % дихлорид ртуті -  $\text{HgCl}_2$  [170]. Раніше вони широко використовувалися, зокрема, діюцид в меристемнотканевій культурі в процесі оздоровлення сортів картоплі [109]. Із-за вмісту ртуті такі препарати є небезпечними речовинами для людини. Ртуть відноситься до першого класу небезпеки, тобто надзвичайно небезпечних хімічних речовин [239]. Останнім

часом з цих та екологічних міркувань дослідники намагаються уникати застосування препаратів, що містять ртуть.

Перекис водню. Це відомий окисник. Значним позитивом його застосування в деконтамінації є те, що після стерилізації не потрібно тривалого промивання тканин водою – достатнім є одне. Залишки пергідролу в тканинах швидко розкладаються молекул води.

Також як стерилізуючі речовини-окисники використовують озон, етиленоксид, пропіленоксид. Досить ефективним деконтаміантом є бета-пропілактон. Ця речовина в 25 рази ефективніша формальдегіду (на жаль, токсичний і канцерогенний) і в 400 разів окису етилену [213].

Етиловий спирт. Використовується в концентрації 90-95 % для попередньої стерилізації об'єктів та покращання дії інших стерилізуючих засобів. Рослинний матеріал занурюють в спирт, а за потреби обпалюють. Експозиція обробки залежить від виду рослин та тканин експланта. Наприклад, для стерилізації експлантів з підземних органів орхідних (*Comperia comperana*, *Platanthera chlorantha*, *Goodyera repens*) застосовується обробка етанолом впродовж 1 хв з наступним використанням інших стерилізантів. У той же час, для бутонів і квіток достатнім було їх занурення в етанол на 30 с [191]. Найчастіше застосовується ступінчаста деконтамінація: перша обробка  $C_2H_5OH$  впродовж 1хв і наступна обробка хлорвмісним препаратом [269, 287].

Бактерицидні властивості мають також органічні і неорганічні кислоти. Їх спороцидна активність пов'язана із здатністю іонів  $H^+$  викликати апуринізацію ДНК за температури  $70\text{ }^{\circ}C$ . Тому, вони можуть застосовуватись для стерилізації середовищ. Після стерилізації кислоти нейтралізують стерильними розчинами лугів [269].

Для деконтамінації експлантів, зокрема обробці насіння, застосовують сірчану кислоту. Крім стерилізуючого ефекту це своєрідна скарифікація насіння яка сприяє газо-водопроникності оболонки і, як наслідок, прискорює проростання насіння [71, 72].

Антибіотики. Не застосовуються для поверхневої стерилізації, оскільки мають відносну видову специфічність. Їх додають у живильні середовища в тих випадках, коли поверхнева деконтамінація є недостатньою через інфікування внутрішніх ділянок експлантів.

Причиною їх застосування є те, що тканини здорових рослин можуть бути колонізовані бактеріями, які дістали назву бактерії-ендофіти. Так, ще в 1951 році J. P. Hollis [285] довів, що бактерії проникають з ґрунту у середину стебла, насіння та бульб картоплі. Наявність будь-яких бактерій і, особливо, ендоефітних в рослинних експлантах є суттєвою проблемою для лабораторій, що займаються культурою тканин рослин [234].

Бактерії, в т.ч. ендоефіти, що залишаються після поверхневої стерилізації експлантів, якщо відразу не проявляються, то потрапляють в рослини-регенеранти, накопичуються і розповсюджуються під час мікроклонування. Також забруднення може відбуватись внаслідок порушення режиму стерильності під час культивування, або неефективного знезараження поживних середовищ [334].

Консерванти та інші речовини. В США розроблено препарат РРМ™ (Plant Preservative Mixture™) який є термостабільним і пригнічує розвиток мікрофлори на середовищах у процесі МКР [266]. Це суміш консерванту та біоцидів. Діючі речовини за даними виробника: 5-Chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolone 0.1350% і 2-methyl-3(2H)-isothiazolone 0.0412% [327].

РРМ™ являє собою широкий спектр консерванту та біоцидів, які вбивають клітини бактерій і грибів, запобігає проростання спор, а в більш високих концентраціях, може усунути в експлантів ендоегенне зараження. Дослідження показали, що активні інгредієнти РРМ™ проникають у гриби або бактерії, в стінки клітини і пригнічують активність ключових ферментів центральних метаболічних циклів, таких як цикл лимонної кислоти і ланцюги перенесення електронів [299, 326]. РРМ можна застосовувати як стерилізуючий розчин (50 %) або додавати в живильне середовище в кількостях 0,05 - 0,1% РРМ™ для трав'янистих рослин і 0,2% РРМ™ для

деревних рослин [210, 265]. За використання середовища з РРМ™ експланти мають бути повністю занурені в нього, тому що на не зануреній частині, яка не контактує із препаратом, розвиватимуться мікроорганізми.

Для стерилізації насіння та вегетативних органів розроблено спосіб із застосуванням гідроксихлориду алюмінію, який одночасно діє як антисептик і антикоагулянт [153].

Всі вище вказані способи є хімічними стерилізаторами. Ведуться розробки із застосуванням різних фізичних методів деконтамінації рослинного матеріалу. Зокрема розроблено і запатентований М.Е. Ламберовою та співавторами [212] та метод іонізуючого опромінення. Стерилізацію експлантів проводять в дистильованій воді дією ультразвукових коливань з інтенсивністю 1...2 Вт/см<sup>2</sup> на робочій частоті 22...44 кГц впродовж 3...6 хвилин. Деконтамінація відбувається за рахунок формування і закривання в водному середовищі кавітаційних пухирців на поверхні експлантів [242]. За таких умов відбувається руйнування патогенних форм без використання хімічних речовин.

Ефективним антисептиком є ультрафіолетове проміння. Особливо доцільно його використовувати у випадках малого розміру об'єктів, які планується ввести в культуру *in vitro*, наприклад, пилки рослин. До ультрафіолетового проміння відносяться електронні хвилі довжиною 0,20 – 0,30 мкм, проте для стерилізації оптимальною є довжиною хвиль 0,26 мкм. Експозиція опромінення 30 хв. гарантує асептичність пилку [212].

Знищуються мікроорганізми також під дією високої температури, але зважаючи на те, що експланти також біологічні об'єкти, цей метод стерилізації не використовується.

***Вплив походження експлантів на ефективність деконтамінації та морфогенез рослин.*** Перед початком МКР велику увагу приділяють відбору маточних рослин, які мають бути типовими для цього ботанічного виду, сорту (форми) і без ознак захворювання. На ефективність введення в асептичні умови та регенераційні процеси значним чином впливає вид



експланта [98]. У цей період вживають заходи щодо зниження рівня інфікованості рослин-донорів експлантів.

Успішність отримання здорового вихідного експланта залежить від його віку, місця і часу відбору та правильно підбраного способу деконтамінації. Наприклад, за клонування *Cercidiphyllum japonicum* Sieb. & Zucc. найбільш контаміновані експланти було ізольовано із донорів, вирощених у ґрунті. Це пояснюється тим, що ґрунт, на якому ростуть донори, характеризується численною патогенною мікрофлорою [44]. Водночас, на удобреному ґрунті за достатньої вологості отримують більш морфогенні експланти. Їх поява в культурі тканин обмежена періодом активного вегетаційного росту. Так, експланти ізольовані весною, мають більші морфогенні потенції ніж ті, що знаходяться в стані спокою. У основі такої сезонності лежать зміни фізіологічного стану рослин під час вегетації, накопичення ендогенних регуляторів росту в тканинах [98].

Окрім онтогенетичної різноякісності на успішне введення об'єктів *in vitro* впливають видові і, навіть, сортові відмінності рослин, що зумовлені також різним вмістом ендогенних гормонів в тканинах. Тому, експланти по-різному реагують на склад живильного середовища і виявляють відмінності в морфогенезі рослин [277].

**Середовища для регенерації рослин з експлантів.** Переважна кількість технологій МКР ґрунтуються на методах, у яких як експланти використовуються конуси наростання пагона – меристеми. Такі технології називають культура меристем. Вона отримала широке застосування для вирішення таких практичних завдань, як введення рослин в асептичні умови і одночасного звільнення рослин від вірусів. У фізіології та біохімії рослин культура *in vitro* апікальних меристем використовується переважно в дослідженнях морфогенезу, зокрема, для вивчення фізіології переходу меристеми з вегетативного в генеративний стан. В умовах культури, верхівкову меристему розглядають як систему, що безпосередньо сприймає як вплив зовнішніх умов (температури, фотоперіоду, освітлення різної

інтенсивності і якості), так і внутрішніх стимулів (гормонів, трофічних речовин, які обумовлюють перехід до цвітіння) [98].

Метод культури меристем з успіхом використовується для масового розмноження сільськогосподарських, лісових та декоративних рослин. Однією з перших культур, меристеми якої промислово почали вводити в асептичні умови й одночасно оздоровлювати від вірусів була картопля [74, 95, 109].

Встановлено, що оптимальним серед досліджуваних середовищ для культивування меристем сортів Світанок київський та Кобза був варіант  $M_2(1)$  з складом: аденін 0,25 мг/л, кінетин – 0,25 мг/л, ІОК – 0,5 мг/л; 2.  $M_2(2)$  - аденін 10 мг/л, гіберелін – 1 мг/л; 3.  $M_2(3)$  - гіберелін – 1 мг/л; 4.  $M_2(4)$  - аденін 20 мг/л, гіберелін – 1 мг/л [109], оскільки при цьому відмічено порівняно високе приживлення меристем. Застосування цього варіанту не вирішує проблему низького відсотку отримання регенерантів. Тому, оздоровлюючи нові сорти Серпанок і Фантазія було випробувано препарат ДГ-75 похідна тетрагідротіофендіоксиду. Він має потрійну активність (цитокінін-ауксин-гіберилінову). Цей препарат синтезований у Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Додавання в живильне середовище 1 мг/л ДГ-75 посилювало ріст рослин. Після трьох тижнів культивування, рослини сорту Серпанок сягали висоти 134 мм, що на 29% більше, ніж у контролі, сорту Фантазія – 103 мм (на 94 % вище контролю). Однак, коефіцієнт розмноження в цьому випадку зменшувався: у контролі було 6,5-6,7 живця, залежно від сорту, а в дослідних варіантах – 4,1 - 6,1 живця. За додаванні в середовище 1 мг/л ДГ-75, подовжуються міжвузля рослин сорту Фантазія, який характеризується вкороченими міжвузлями. Тому, доцільним є застосування препарату для покращення технології живцювання сортів із вкороченими в умовах *in vitro* міжвузлями. Таким чином, оптимальним для регенерації меристем сортів Кобза та Світанок київський було середовище  $M_2(1)$ . Заміна в ньому фізіологічно активних речовин на 1мг/л ДГ-75 дозволило поліпшити

регенераційний процес, зробити його теоретично менш ризикованим з боку впливу штучних біологічно-активних речовин та кількості гормонів у штучних живильних середовищах [109].

Первинне культивування експлантів, порівняно із постійним асептичним вирощуванням, найчастіше передбачає модифікаційні зміни в прописах живильних середовищ:

- додавання антисептиків, наприклад, нітрат срібла [177] або біоцид РРМ [314];
- використання більш прозорих згущувачів [342] для кращого виявлення контамінантів;
- для активного виявлення бактеріальної мікрофлори додавання органічних добавок, наприклад, гідролізату казеїну, який провокує розвиток сапрофітних мікроорганізмів [256, 296].
- зменшення вмісту мінеральних речовин [288];
- змінювання вмісту ауксинів, цитокінінів та додавання гіберелінів [309];
- додавання антиоксидантів, наприклад, полівінілпіролідон, цистеїн, та збільшення вмісту вітаміну С [98, 165];
- додавання адсорбентів таких, як активоване вугілля [98].

***Проблеми, пов'язані із утворенням регенерантами фенолоподібних речовин під час перших субкультивувань.*** Цей процес притаманний для більшості видів під час переведення з умов *in vivo* в *in vitro* і супроводжується фенольною інтоксикацією експлантів. Після введення в культуру *in vitro* експланти виділяють у середовище продукти вторинного обміну, які пригнічують їх ріст та розвиток. Це, особливо, актуально для деревних видів, зокрема дуб та горіх [261].

Фенольними називають сполуки (на сьогодні їх відомо понад тисячу), які містять у своїй молекулі ароматичне (бензольне) кільце, яке несе одну, дві або більше гідроксильних груп. Ці речовини широко розповсюджені у рослин. Вони є одними із найбільш поширених вторинних метаболітів в тканинах

вищих рослин. Їх синтез зберігається й за культивування клітин та тканин в умовах *in vitro* [92].

Встановлено, що зростання рівня диференціації клітин супроводжується збільшенням їх здатності до утворення поліфенолів. Так, в мікропагонах рослин-регенерантів які знаходяться на стадії стійкої проліферації, вміст фенольних сполук вище, ніж в калюсних тканинах. В тканинах інтактних рослин та ініційованих з них рослин-регенерантів фенольні сполуки виявлені, переважно в епідермі, зоні провідних пучків [87].

Дані окремих дослідників щодо впливу фенольних сполук на процеси ризогенезу мають дискусійний характер. Ряд авторів [72, 98, 209] вважають, що в процесі ризогенезу фенольні речовини відіграють другорядну роль, порівняно із фітогормонами, але вони здатні змінювати рівень ауксинів, виступаючи протекторами чи активаторами процесів їх окиснення. В модельних дослідах показано, що моногідроксильні феноли виступають кофактором ауксиноксидази (руйнуючи ауксини) і гальмують ріст рослин. За даними інших дослідників [76, 162, 163] дигідроксильні феноли, навпаки, виявляють інгібуючу дію на ауксиноксидазу і стимулюють ростові процеси.

Наприклад, первинне культивування експлантів скумпії, дуба і церсису було ускладнене активним синтезом, накопиченням та виділенням в живильне середовище речовин фенольної природи, що призвело через 2-3 тижні культивування до масової загибелі культур [8]. Їх утворення пов'язано з тим, що під час культивування мікроживцюванням *in vitro* в багатьох рослин, особливо деревних та чагарникових порід, часто внаслідок механічного пошкодження при ізолюванні експлантів (травмування під час живцювання) спостерігається виділення фенольних сполук в живильне середовище у вигляді темно-коричневих плям. Відомо, що синтез фенольних сполук антагоністично впливає на клітинну проліферацію, зменшує ефективність засвоєння регенерантами азоту [71] та знижує ризогенез [194]. Ці сполуки також виділяються рослиною у відповідь на стресову ситуацію, наприклад, внаслідок травмування або дії фітовірусної інфекції [228].

Одночасно спостерігається вихід фенолів з вакуолей в плазму та їх окислення локалізованими там ферментами з утворенням ристінгібуючих продуктів [195]. Вплив фенолів та інших чинників обумовлює зменшення регенераційного потенціалу за тривалого субкультивуванні [71, 98, 194].

Вирішення проблеми самоотруєння продуктами окиснення фенолів пропонують вирішувати додаванням в живильне середовище різних речовин, наприклад збільшення концентрації гліцину при вирощуванні *in vitro* рідкісних видів орхідних флори Криму. Встановлено, що період активного росту проростків орхідних супроводжувався виділенням в живильне середовище значної кількості фенольних сполук, які уповільнювали їх ріст. Причому, це відмічалось лише у видів, схильних до їх утворення і в процесі культивування експлантів дорослих нативних рослин. Це види, які зростають на відкритих просторах: на узліссі та світлих схилах: *Ophrys oestrifera*, *Anacamptis pyramidalis*, *Himantoglossum caprinum*. Певно, таку здатність ці орхідні набули в процесі еволюційних пристосувань та алелопатичних взаємодій рослин в фітоценозі [192].

Склад живильного середовища, яке використовується для регенерації рослин *Cymbidium Sw.* модифікований у відділі біотехнології Нікітського ботанічного саду, для видів, що інтенсивно виділяють феноли. При цьому, застосовували підвищені концентрації гліцину (50,6-63,2 мкМ), як за культивування проростків, так і органів природних рослин. Найкраще коренеутворення відзначене за використання ІМК і НОК в концентрації 2,46 мкМ та 2,69 мкМ, відповідно [193, 246].

Поширеним в практиці є часте пересаджування експлантів [98]. Наприклад, для малини пропонують проводити за перших субкультивувань пересаджування експлантів щотижня [91]. У випадку із експлантами горіха встановлено, що інтенсивне виділення фенольних речовин у живильне середовище спостерігалось у 8-35% експлантів, але часті пересадки (через 2-7 діб) дозволяли мінімізувати це явище [222]. Тобто, в кожному окремому випадку для усунення фенолоутворення експлантами застосовують

різноманітні способи нейтралізації згубної дії цих речовин на ріст і розвиток *in vitro*.

На першому етапі в склад середовища додають антиоксиданти, що попереджують активацію гідролітичних ферментів та загибель експлантів [246]. Зокрема для введення експлантів троянди в живильне середовище доповнюють 50 мг/л аскорбінової кислоти і 150 мг/л полівінілпіролідону, оскільки відомо, що аскорбінова кислота в рослинному організмі відновлює феноли до нетоксичних сполук [92]. Також ефективним було додавання в середовище лимонної та аскорбінової кислот під час перших культивувань смородини чорної [176]. Можна також замочувати експланти в розчині полівінілпіролідону перед висадкою [98].

Певний вплив на утворення фенолів мають і гормони. Вміст фенольних сполук у культивованих тканинах зумовлений співвідношенням ауксин:цитокініни [335]. Абсцизова кислота поряд із прискоренням дозрівання рослин, пригніченням росту, вповільнює утворення розчинних фенольних сполук [96, 218].

Щоб нейтралізувати виділені феноли також рекомендують [98] додавати активоване вугілля (1-2 г/л), адсорбційні властивості якого сприяють рівномірному розподілу елементів живлення в середовищі та нейтралізації продуктів метаболізму.

Отже, поряд із екзогенним контамінуванням стримуючим чинником першого етапу МКР є самоотруєння регенерантів фенольними ексудатами. Вирішення цієї проблеми є диференційованим залежно від біологічних особливостей видів рослин.

#### **1.4. Особливості онтогенезу рослин *in vitro***

Як відомо, розвиток вищих рослин розподіляють на такі етапи: ембріональний, ювенільний, репродуктивний (зрілість і утворення насіння), сенильний (старість, відмирання). Згідно теорії М. П. Кренке, [89] перехід організму від ембріонального етапу до молодості та зрілості – це поступові

процеси, пов'язані зі старінням. Він вважав, що розвиток – це процес старіння, який є циклічним і тісно пов'язаний з протилежним процесом – омолодженням [88]. Культура тканин, зокрема МКР є основою безвірусного насінництва багатьох сільськогосподарських культур. Отримані безвірусні лінії *in vitro* підтримуються шляхом вегетативного розмноження багато років [109]. Тому, актуальним є пізнання природи старіння рослин та протилежного цьому явищу феномену збереження рослин в ювенільному стані або ювенілізації рослин, що перейшли до більш пізніх етапів розвитку (генеративного, сенильного).

***Старіння і омолодження рослин та органів в онтогенезі.*** Старіння рослинного організму викликається як внутрішніми, так і зовнішніми чинниками, але найбільш дієвими є молекулярно-генетичні порушення та порушення відношень між окремими органами рослин. Водночас, з віком збільшується кількість молекул ДНК міцно пов'язаних з білками ядра клітини, що мають назву гістонів, тобто зростає кількість ДНК блокованих гістонами. Внаслідок цього, група генів, що відповідає за синтез структурних та ферментних білків послідовно виключається із синтетичних процесів і загальний рівень метаболізму клітини гальмується [27].

Порушення в генетичному апараті спостерігаються впродовж усього життя організму, але в клітин молодшої рослини відхилення від норми усуваються спеціальною репараційною системою клітин. З віком та під впливом несприятливих чинників активність такої системи знижується і кількість генетичних помилок у синтетичних процесах зростає. Цим викликається зростаюча дезорганізація процесів життєдіяльності, організм втрачає здатність до активного опору, старіє і відмирає. На старіння організму має значний вплив порушення взаємного впливу метаболічних відношень між окремими органами рослин: корінням і пагонами, листками і плодами, насінням, що формується, і листками, а також забезпеченістю рослин світлом, вологістю, теплом, елементами мінерального живлення та їх співвідношенням [164].

Подовжує період вегетації надлишкове азотне живлення, а фосфорне прискорює дозрівання, а отже і старіння рослин. Цьому також сприяє нестача вологи та підвищена температура [27, 164].

Регулюється цей процес і формуванням насіння. Коли, наприклад, у льону видалити квіти під час цвітіння, то рослини будуть вегетувати до пізньої осені, але на варіанті, де їх залишили, вегетація призупиняється і рослини відмирають після дозрівання насіння – наприкінці липня-початку серпня [27].

Згідно з основними положеннями теорії циклічного старіння та омолодження рослин [89], під час онтогенезу індивідуум неодмінно старіє і вмирає. Тривалість життя особини зумовлена еволюційними чинниками, які можуть змінюватись під впливом зовнішніх умов розвитку. Старіння відбувається безперервно, але нерівномірно – як цілого організму, так і окремих його частин. У процесі загального індивідуального старіння новоутворення нових частин рослини обов'язково призводить до нерівномірного циклічного омолодження. Утворені дочірні клітини є тимчасово омолодженими. Механізм та інтенсивність процесів старіння клітин у стані спокою і тих, що активно діляться, дуже відрізняються. Найбільш повільно старіють клітини меристемних тканин у стані спокою.

Існує два поняття віку – власний вік частини рослини (строк від моменту її закладання до даного моменту), і загальний вік цієї ж частини рослини, що складається з її власного віку і віку рослини до моменту закладання цієї частини [226].

Останнім часом старіння розглядається як послаблення з віком процесів життєдіяльності організму, яке призводить у кінцевому підсумку до природного відмирання. Старіння виявляється як прогресуюче порушення біосинтезу білків, послаблення регулюючих систем, накопичення малоактивних структур і припинення фізіологічних функцій. Омолодження, навпаки, розглядається як посилення процесів життєдіяльності, пов'язаних з інтенсифікацією синтезу нуклеїнових кислот і білків, активації ділення



клітин та їх росту, виникнення й накопичення ембріональних тканин, загальній активізації фізіологічних функцій [27].

***Особливості ювенільного етапу розвитку рослин.*** Ювенільний етап розвитку розпочинається з проростання насіннини чи пробудження органів вегетативного розмноження (бульби, цибулини, бруньки тощо) і характеризується швидким нагромадженням вегетативної маси. На даному етапі рослини не здатні до статевого розмноження. Тривалість ювенільного етапу у різних видів не однакова: від кількох тижнів (у однорічників) до десятків років (кущі, дерева). Ювенільний стан у рослині підтримується специфічним співвідношенням фітогормонів [164].

Вікові етапи рослин не завжди візуально можливо встановити (наприклад, у злаків) хоча і є певні морфологічні ознаки, характерні для кожного етапу розвитку. Зокрема, на відміну від зародків з їх гетеротрофним живленням і розвитком, сходи або проростки є вже самостійними рослинами з кореневою системою фотоасиміляційним апаратом. Але вони ще використовують запасні поживні речовини. Характерною ознакою проростків вважається наявність в них зародкових листків – сім'ядолей.

Ювенільні рослини на відміну від проростків, абсолютно самостійні в власному автотрофному живленні завдяки листкам та розвиненій кореневій системі. Морфологічно вони найчастіше відрізняються від дорослих рослин своєрідністю листків, їх розміщенням. Ці відмінності ускладнюють їх видову ідентифікацію в природі.

Ювенільні рослини мають високу чутливість до навколишнього середовища і піддаються значному впливу його факторів. Зміни, індуковані впливами навколишніх умов, проявляються в подальших етапах онтогенезу [93, 206]. Морфологічна своєрідність ювенільних рослин проявляється в усіх органах. Часто це відмінності в будові, гілкуванні та їх відновленні. Первинні листки ювенільних рослин найчастіше вирізняються слабкою диференціацією та недосконалістю розчленованості листової пластинки. Наприклад, перші листки конюшини не трійчасті а прості, так само як і перші листки суниці.

Перехід в онтогенезі рослин від простих до складних листків чітко проявляється у видів еспарцету (Васильченко І. Т., 1945) та в дерев із розсіченими листками, наприклад: грецький горіх, ясен [206]. В голонасінних видів первинні листки (хвоя) ювенільних рослин часто відрізняються від розвитку їх на пізніших етапах. У видів *Juniperus* з лускоподібною хвоєю – *J. sabina*, *J. twkestanica* – проросткам притаманна голкоподібна хвоя, яка пізніше змінюється на лускоподібну. Це ж спостерігається і у видів *Cupressus* та *Tuja*. У виду *Picea excelsa* впродовж перших років життя на головних осях розвиваються хвоїнки сплюснуті з боків. З віком хвоя набуває в перерізі квадратної форми, і врешті решт стає значною мірою сплюснутою в дорзовентральному напрямі. Одночасно збільшується кількість рядів продихів на будь-якій грані хвої [206].

Як вже згадувалось, будь-який показник – чи то морфологічний, анатомічний або фізіологічний характеризується помітною тенденцією вікових змін. Наприклад, листки мають можливості змінюватися від черешкових до сидячих, від менш до більш розчленованих, від меншого вмісту хлорофілу до зростання його кількості і т.п. Крекне Н.П. [89] простежив зміни в юних рослинах. Наприклад, у розсади капусти він виділив такий показник як довжина черешка. В ході онтогенезу черешкові листки змінюються сидячими. Нескладні заміри та дослідження демонструють, що екземпляри, в яких швидше зменшується умовна довжина черешка (співвідношення довжини черешка до довжини всього листка), вважаються більш скороспілими; екземпляри в яких даний показник змінюється повільніше – виявляються більш пізньостиглими [88, 89, 206].

Отже, ювенільний стан рослин впливає на наступні етапи розвитку рослинного організму і дослідження, пов'язані з цим етапом розвитку рослин, є актуальними для насінництва та фізіології рослин.

**Ювенілізація в умовах *in vitro*.** З літературних даних відомо, що МКР генетично цінних екземплярів деревних порід значно ускладнене низькою регенеративною активністю рослин старого та зрілого віку. Найлегше

досягнути морфогенез за використання 1-3-річних сіянців та зародків, а старий матеріал є найскладнішим для введення в культуру *in vitro* [107].

Ювенільність та старіння загалом викликають цілий ряд дискусій хоча б тому, що строки старіння та ювенільності чітко невизначені. Одним з маркерів старіння можна вважати втрату здатності до вкорінення. Це властиве багатьом рослинам, що досягли зрілого віку і актуальне для всіх способів вегетативного розмноження, в тому числі і мікроклонування. Іноді, перед введенням у культуру, рослини реювенілізують шляхом щеплення живців старих дерев на 2-3-річні сіянці або мікрощеплення *in vitro* [271].

Водночас досить багато дослідників однією з переваг МКР вважають здатність до реювенілізації матеріалу в культурі *in vitro*. Gupta P.K. з співавторами [281] виявили, що експланти, отримані з 20-річних дерев, нездатні до вкорінення, проте після трьох пересадок проявили ризогенез і з кожним новим пасажем вкорінення відбувалось все легше. Досить часто в рослин, що перебували в культурі *in vitro* впродовж 1-2 років, спостерігали спонтанний ризогенез [271].

Здатність до реювенілізації доведено на морфологічному та біохімічному рівнях. У процесі вивчення біохімічних та морфологічних ознак берези після 1, 4 та 8 пересадок, M.N. Brand та R.D. Lineberg [263] та O.O. Марчук і В.І. Кирилюк [107] показали, що в процесі субкультивувань відбулись значні морфологічні та біохімічні зміни. Прояв їх у мікроклонованих дерев дуже відрізнявся від материнських і був подібний до характеристик, властивих сіянцям.

Для деревних також визначено, що незалежно від виду, живці, взяті із пагонів з “ювенільними ознаками”, мають завжди вищу ризогенну здатність, а їх саджанці – більший річний приріст пагонів, що значно прискорює отримання садивного матеріалу [54]. Під час введення в культуру *in vitro* шовковиці білої в якості експлантів, найкращого результату досягнуто завдяки відбору бруньок ювенільних рослин на початку вегетаційного періоду [45]. Для культивування рододендронів, як і для багатьох інших

деревних рослин встановлено, що кращі регенераційні властивості мали ембріональні та ювенільні тканини: вони краще зберігали життєздатність і швидше розмножувались [236, 325]. Зрілі тканини характеризувались низькою регенераційною здатністю.

Індивідуальний розвиток рослин за вегетативного розмноження можна розглядати з одного боку як онтогенез однорічної рослини, а з іншого, як онтогенез багаторічної. Так, картопля переносить несприятливі умови у формі видозміненого підземного стебла – бульби і за сприятливих умов відновлює ріст через певний проміжок часу. Це пов'язано з тим, що картоплі, хості та багатьом іншим культурам властиві два види розмноження: генеративне – ботанічним насінням і вегетативне – бульбами, живцями, кореневищами і т.п.

Наприклад, згідно даних Ю.Г. Тринклера [226], картопля має великий та малий цикли онтогенезу. Великий цикл – це тривалість життя сорту (клону), малий, або ж як його ще називають індивідуальний – розвиток бульби, пагона.

Процес індивідуального розвитку кожної рослини супроводжується низькою закономірних змін, властивих певному біологічному виду. Сукупність цих фізіолого-біохімічних і морфологічних змін, зумовлених генетичними факторами, які реалізуються в рослинному організмі, починаючи від його виникнення із зиготи, спори або спеціалізованого вегетативного зачатка до природної смерті, у звичайних умовах середовища позначають поняттям життєвого циклу або онтогенезу.

Складовими онтогенезу є ріст та розвиток. Ріст є основою для низки фізіологічних процесів і характеризується такими фундаментальними проявами, як ритмічність, полярність, диференціація, подразливість, кореляція. Характер росту будь-якого організму, органа або популяції клітин має вигляд *S*-подібної кривої росту (рис. 1.1). Вона складається з 4-ьох фаз росту: I – фаза прихованого росту (лаг-фаза), яка властива переважно

ембріональному етапу онтогенезу та розвитку насіння до проростання. За такого росту організм помітно не збільшується в розмірах.

Ця фаза характеризується з новоутворенням нуклеїнових кислот (ДНК і РНК), біосинтезом білків-ферментів і фітогормонів [155].

II – фаза інтенсивного росту (лог-фаза) відповідає ювенільному періоду онтогенезу і триває від сходів до початку формування генеративних органів. Під час цієї фази відбувається активний ріст клітин розтягуванням; з'являються нові тканини, органи, збільшуються їх розміри. У рослини спостерігається значне збільшення розмірів вегетативних органів: стебла, листків, коріння. В цій фазі найкраще відбувається регенерація вегетативних органів.

III фаза – уповільненого росту. Вона властива репродуктивному етапу онтогенезу. У цей час рослина менше витрачає пластичних речовин на побудову вегетативних органів, а більшою мірою вони використовуються на формування генеративних органів та насінини. Під кінець фази накопичуються речовини – інгібітори. За таких умов уся рослина або окремі її частини можуть переходити у стан спокою. Низкою дослідників встановлено, що експланти ізольовані із рослин-донорів у цій фазі майже не утворюють рослин-регенерантів [98].

IV фаза – стаціонарного стану. У цей період розміри рослин не змінюються і ріст в однорічних рослин завершується, а багаторічних припиняється.

Тривалість кожної із складових S-подібної кривої і характер її проходження залежать від зовнішніх і внутрішніх факторів.

Впродовж життя організм не тільки росте, але й змінюється, тобто розвивається. Розвиток – це якісні фізіологічні, біохімічні і морфологічні зміни, які відбуваються в процесі новоутворення елементів структури

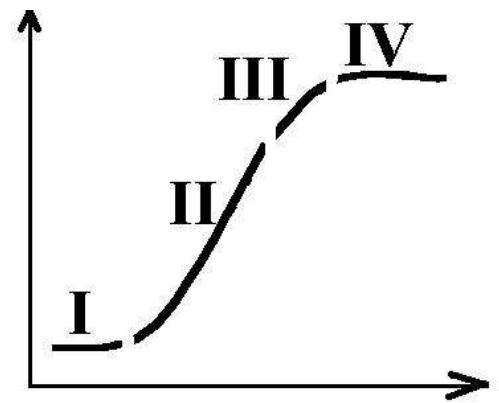


Рисунок 1.1. – S-подібна крива

організму в життєвому циклі. В поняття “розвиток” входять також і вікові зміни.

На відміну від тварин, рослини в процесі онтогенезу можуть утворювати нові тканини і органи. Процеси новоутворення відбуваються в меристемних тканинах. Основні частини пагона закладаються в його апікальній частині, яку ще називають конусом наростання або меристемою.

У звичайних умовах (*in vivo*) – онтогенез однорічного пагона в усіх покритонасінних рослин включає ряд послідовних етапів органогенезу [206]. Перехід від одного до іншого етапу ініціюється внутрішніми і зовнішніми факторами (фотоперіод, сума ефективних температур, накопичення в організмі тих чи інших речовин тощо).

Для усіх покритонасінних рослин характерна однакова послідовність розвитку конуса наростання. Згідно з даними Ф.М. Куперман [206] розвиток однорічного пагона проходить в 12 етапів органогенезу.

Перші його етапи, що співпадають з ювенільним періодом індивідуального розвитку, ще називають вегетативними. У цей період рослинам властивий посилений ріст і висока регенераційна здатність. Однак, з переходом до репродуктивних етапів органогенезу, які зовні проявляються в картоплі як початок бутонізації, регенераційна здатність рослин різко знижується або взагалі втрачається [15].

В умовах *in vitro* за МКР нові рослини регенеруються з бруньок після живцювання материнських рослин. За такого розмноження складається враження, що рослини не завершують свого онтогенетичного циклу впродовж 10-15 і більше років.

Ми вважаємо, це обумовлено фізіолого-біохімічними реакціями, які забезпечують проходження ростових процесів і визначаються як механізми росту. Відрізняють первинні й вторинні механізми росту.

До перших відносять фізіолого-біохімічні реакції, що забезпечують початкові етапи ростового процесу (лаг-фаза) і фази прискореного росту (лог-фаза) [27]. Сюди ж належать електро-фізіологічні, гормональні й генетичні

реакції, які запускають і підтримують нормальний хід росту клітин, тканин і органів [164].

Вторинні механізми росту – це фізіолого-біохімічні реакції, які беруть участь у процесі онтогенезу рослин. До них належать кореляції між органами, донорсько-акцепторні зв'язки, метаболічні координації між ростом та іншими фізіологічними процесами: фотосинтезом, транспортом, відкладанням запасних речовин [27].

Згідно з твердженням Ж. Берньє та співробітників [15] та ще деяких дослідників [27, 47] у процесі вирощування рослин у чітко визначених неіндукованих умовах вони можуть тривалий час знаходитись на певному етапі розвитку. Також вважають, що за тривалої відсутності індукуючого впливу можливе повернення меристем до попереднього етапу (типове для меристем у вегетативному стані).

Тобто, ми припускаємо, що рослина-регенерант в умовах *in vitro*, яка утворилась за вегетативного розмноження, проходить лише вегетативні етапи онтогенезу на відміну від рослин за насінневого розмноження *in vivo*.

Набуття ювенільних ознак *in vitro* відомо для багатьох культур, зокрема порівняльна оцінка розмноження зеленими живцями двох сортів вишні, свідчить про доцільність використання маточних рослин за розмноження в культурі тканин лише на початковому етапі. За використання живців із розмножених *in vitro* рослин, відсоток вкорінення живців збільшувався в 2-4 рази, кількість коренів в 1,6 – 3,2 рази, порівняно із звичайною технологією живцювання [181].

У ювенільних рослин *Laelia Lindl.* у пазухах термінальних листків розташовуються резервні бруньки поновлення, з яких в майбутньому розвиваються окремі рослини. Характерно, що у генеративно зрілих екземплярів цього виду подібні бруньки не виявлені [66].

Отже, крім надзвичайно високих коефіцієнтів розмноження, в поєднанні з культурою меристем, МКР дозволяє отримати ювенільні рослини. Для довготривалого культивування в асептичних умовах необхідно

використовувати вихідні експланти *in vitro* для живцювання з ювенільних рослин.

***Гетеротрофне живлення як одна з причин ювенільного стану регенерантів в умовах in vitro.*** В нативних умовах більшість вищих рослин основну частину життя ведуть як автотрофи. Лише в період формування проростків з насіння, або органів вегетативного розмноження рослинний організм веде гетеротрофний спосіб життя за рахунок запасних поживних речовин.

Ювенільний період онтогенезу М. М. Макрушин та ін. [230] розділяє на гетеротрофну й автотрофну фази. Гетеротрофна, в свою чергу, має дві стадії: гетеротрофну ембріональну – це початковий етап проростання насіння, коли перші поділи клітин зародка, що проростає, здійснюються за рахунок утилізації власних запасних речовин, і гетеротрофну ендоспермальну – коли подальший розвиток проростка йде за рахунок запасних речовин ендосперму. З утворенням перших продуктів фотосинтезу починається автотрофна фаза.

*In vitro* більшість технологій культивування рослинних об'єктів передбачає додавання вуглеводів, які за хімічною природою та й за використанням клітинами близькі до запасних поживних речовин ендосперму. Наприклад, крохмаль, як складова запасних поживних речовин під час гідролізу розпадається до простих цукрів: моно- та дисахаридів. Так само й в живильні середовища додають дисахариди (наприклад, сахарозу), рідше моносахариди (глюкозу), або полісахариди – крохмаль. Водночас, більшість дослідників схильні до того, що *in vitro* за наявності цих вуглеводів рослинні об'єкти взагалі не фотосинтезують, або надходження поживних речовин за рахунок фотосинтезу незначне. Інколи це називають ще як міксотрофний спосіб живлення, але автотрофна доля в ньому дуже мала [72, 98].

Все це дає підстави вважати, що *in vitro* на штучних живильних середовищах рослинним клітинам, цілим організмам притаманний гетеротрофний спосіб живлення.



### **1.5. Детермінація онтогенезу в умовах *in vitro***

Регуляція онтогенезу і морфогенезу також здійснюється на внутрішньоклітинному, міжклітинному та на рівні цілого організму. На першому з них виділяють метаболітичну, мембранну та генетичну системи регуляції. Міжклітинні системи регуляції – трофічна, гормональна та електрофізіологічна. Ріст і розвиток регулюються насамперед на клітинному рівні. Ріст органа або організму складається з росту його клітин, а морфогенез, тобто утворення специфічних форм організації органа чи організму, є результатом тих шляхів розвитку, яких зазнають окремі клітини. Детермінація шляхів розвитку кожної клітини є основою фізіології розвитку. В процесі детермінації клітина робить вибір власного шляху розвитку із численого набору потенційних можливостей [164]. Найбільш дієвими детермінантами спрямування онтогенезу біологічних об'єктів *in vitro* і такими, які піддаються регулюванню згідно технологічних потреб є трофічні та гормональні детермінанти.

#### **1.5.1. Гормональна детермінація онтогенезу**

Біологічні технології передбачають технологічні процеси з використанням як засобу і (або) предмету виробництва об'єкти природного походження. Для управління цими технологіями крім фізичних факторів (температура, світло і т.д.) ефективними є різноманітні фізіологічно активні речовини – індуктори, які виконують функції стимуляції або інгібування ростових, метаболічних та формотворчих процесів. До індукторів можуть бути віднесені як регулятори гормонального типу, які здатні переміщуватися по рослині на далекі відстані, так і міжклітинні та внутрішні регулятори близької дії. Екзогенні гормони проявляють свій вплив через зміни балансу ендогенних гормонів [171].

Гормональна система тісно пов'язана з генетичним апаратом клітини. Фітогормони впливають на експресію генів. Це призводить до активації структурних генів, що контролюють синтез тих чи інших ферментів (рис.

1.2.). Відповідно змінюючи співвідношення гормонів у поживних середовищах, можна значною мірою змінювати і хід реалізації генетичних програм клітин та тканин [72].

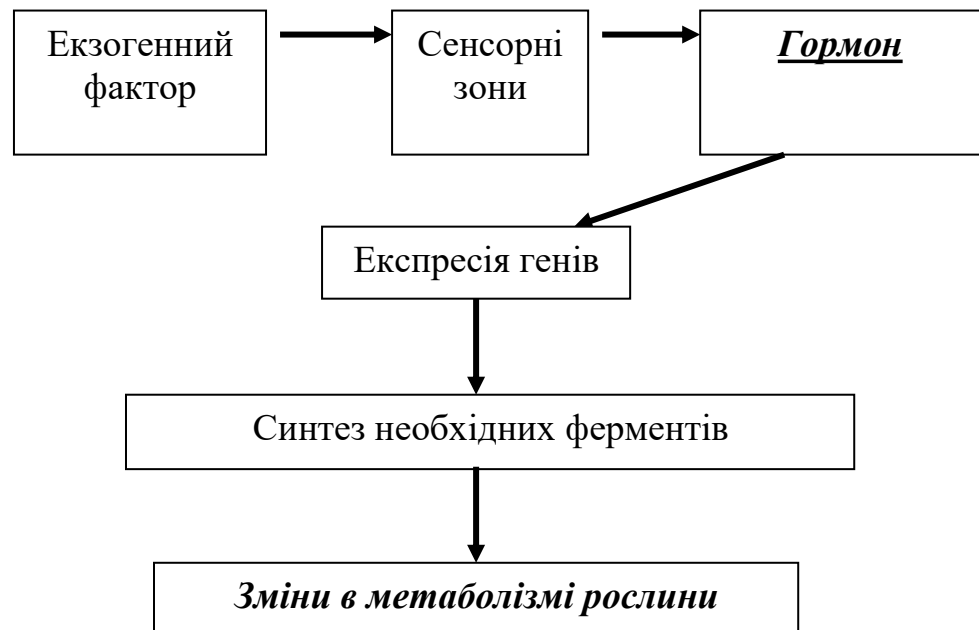


Рисунок 1.2. – **Зміни метаболізму рослин залежно від гормонів** (за Ф.Л. Калініним, [72])

Серед експлантів різних сортів одного й того ж виду рослин часто спостерігається різна реакція на додані в середовище регулятори росту, що відображає певною мірою ендогенне співвідношення ростових речовин, яке є генетично обумовленою ознакою сорту [171].

Ці речовини впливають на диференціацію і дедиференціацію клітин і тканин, ініціюють гістогенез, індукують поділ та розтягування клітин, беруть участь у процесах старіння і дозрівання, стимулюють чи інгібують ріст і розвиток клітинних культур, зумовлюють формування статі. В біотехнологічних дослідженнях найчастіше використовують гормони, що стимулюють ріст і розвиток: цитокініни, ауксини, гібереліни [98, 147].

Відкриття цитокінінів започаткувало еру культивування рослинних клітин *in vitro*. Першим типом культивованих тканин був калюс, отриманий із

серцевинної паренхіми тютюну. У природі калюси утворюються в місцях пошкодження. Коли рослині необхідно якомога швидше закрити клітинами рану, заповнюючи його безформною недиференційованою масою клітин. І лише пізніше відбувається диференціація і відновлюються пошкоджені судини, покривні і механічні тканини [92, 147].

Для того, щоб рослинні об'єкти швидко розмножувались *in vitro*, в середовище необхідно додавати ауксини і цитокініни. Зміни в співвідношенні ауксин/цитокінін (ауксинцитокініновий індекс) спричинюють суттєві зміни в розвитку клітин, тканин *in vitro*. У 1955 році Скуг і Міллер запропонували гіпотезу гормональної регуляції в культурі клітин і тканин, яка нині відома як правило Скуга-Міллера [151, 152]: у разі переважання ауксинів (нестачі цитокінінів) розпочинається процес *ризогенезу* (від грецького *rhizo* – корінь; *genesis* – народження), якщо ж переважають цитокініни (недостача ауксинів), утворюються меристеми пагонів: розпочинається *геммагенез* (*gemma* – брунька рослини).

Така поведінка культур клітин добре узгоджується з функцією ауксинів і цитокінінів як “гормонів добробуту” пагонів та коренів, відповідно. Нестача ауксинів сприймається клітинами як недостатній розвиток пагонів і є сигналом для їх утворення. У диференційованих пагонах відбувається синтез ауксинів і баланс гормонів відновлюється. Аналогічний механізм спрацьовує за нестачі цитокінінів (утворюються корені).

У разі видалення із середовища ауксинів і цитокінінів часто в культурі клітин розпочинається утворення біполярних сполук – *зародків*. У кожного з них буде своє джерело цитокінінів (кореневий полюс) і своє джерело ауксинів (пагоновий полюс). Такі структури, схожі на зародок насінини, називають *ембріоїдами*: *embryo* – зародок; *eidōs* – схожий [27].

Цитокініни – це похідні пурину (аденіну), які стимулюють поділ клітин та їх диференціювання, а також затримують процеси старіння. Найбільш відомі цитокініни це: кінетин - 6-фурфуріламінопурин [151], зеатин [98], 6-

БАП – 6-бензиламінопурин, TDZ тидіазурон [332]; 2-ізопентіладенін [264, 302].

Цитокиніни виявлено в різних тканинах рослин, але особливо багаті на них кінчики коренів, ксилемний сік, насіння, що проростає, пухлини корончатих галів [164, Калинин Ф. Л. та ін., 1992). Як і ауксини цитокиніни проявляють атрагуючу дію, тобто посилюють пересування поживних речовин до збагачених ними тканин. На молекулярному рівні цитокиніни в комплексі зі специфічним білковим рецептором посилюють активність РНК-полімерази та матричну активність хроматину. Це зумовлює збільшення кількості полірибосом та активацію синтезу білків. Кінцева дія цитокинінів – зміна експресії генів на транскрипційному рівні. Цитокиніни, як і ауксини, активно застосовуються в експериментах з культурою тканин. Вони мають важливе значення для різних біотехнологічних процесів [ 92, 98, 147].

Серед цитокинів першим був описаний кінетин, виділений в лабораторії Ф. Скуга із старих зразків ДНК оселедця, а також інших зразків ДНК, що автоклаувались у кислому середовищі. Кінетин не є природним цитокиніном, хоча він структурно споріднений з цілою низкою природних цитокинінів, що існують у рослинах і як окремі сполуки, і як глікозиди [13, 92].

Загальноновизнаним є механізм реакції окислення цитокинів [295]. Він полягає в тому, що цитокиніноксидаза окислює зв'язок між N<sup>6</sup> залишку аміногрупи і C<sub>1</sub> ізопреноїдного ланцюга, в результаті цього утворюється імінопурин, який в свою чергу гідролізується, утворюючи альдегід і аденін [207].

Встановлено, що в деяких системах додавання екзогенних цитокинінів викликає значне і відносно швидке, але тимчасове підвищення активності цитокиніноксидази. Час виявлення, ступінь і тривалість стимуляції ферментативної активності залежить від виду і концентрації гормону, а також типу рослинної тканини [317]. Існує повідомлення про те, що надлишок ауксинів може стимулювати активність ауксиноксидази [207].

Ауксини. Найбільш поширений представник індоліл-3-оцтова кислота ( $C_{10}H_9NO_2$ ) – біла кристалічна речовина з молекулярною масою 175,19 і температурою плавлення 168 °С. На світлі швидко темніє. Максимум поглинання знаходиться в області 279 нм. ІОК добре розчинна в метиловому, етиловому і інших спиртах, в сірчаному ефірі і етилацетаті, погано – у воді, бензолі, хлороформі, краще розчинна в гарячій воді. ІОК швидко розкладається в кислому середовищі та за наявності окисників, наприклад,  $H_2O_2$ . В лужному середовищі більш стабільна [241].

Індолілоцтова кислота – головний природний ауксин – швидко розщеплюється ферментом індолацетатоксидазою. Активність цього ферменту гальмують деякі ортодифеноли. Їх стимулююча дія на ріст була відома досить давно, і спочатку вважали, що ці речовини і є ауксини; насправді ж їх стимулююча дія пояснюється тим, що вони пригнічують активність індолацетатоксидази, а це веде до підвищення вмісту в тканинах рослини ендогенної індолілоцтової кислоти [91].

Ауксини були відкриті в зв'язку з вивченням росту розтягуванням і тропізмів у рослин, проте їх функції набагато ширші і, по суті, охоплюють всі сторони життєдіяльності рослинного організму. Ауксин є обов'язковим учасником координації процесів морфогенезу, рухової і функціональної активності в рослин. Присутність ауксину (разом з цитокініном) абсолютно обов'язкова для індукції ділення клітин. Ауксин необхідний перш за все для ініціації реплікації ДНК. Перехід клітин до мітозу і цитокінезу залежить, як правило, також від присутності цитокініну, проте високі концентрації ауксину здатні і без цитокініну викликати мітоз в соматичних клітинах рослин [91, 258].

Численні дані [27, 91, 92, 258] свідчать про вплив ІОК і її синтетичних аналогів на мітотичну активність тканин у цілих рослинах. Відомо, що ІОК, особливо навесні, в апікальних меристемах в період їх інтенсивного росту функціонально активує камбій. Під впливом ауксину починається розростання тканин зав'язі, причому на початку ІОК виділяється пилком, а

потім насіння, яке розвивається, стає продуцентом ІОК та інших фітогормонів. Надходження ІОК у тканини плоду – обов'язкова умова його формування плоду. Із надходженням ауксинів плід стає активним атрагуючим центром. Прикладом дії ІОК на розподіл клітин є індукція утворення коренів. Але при зануренні проростків коренями в розчин ауксину з високою концентрацією спостерігається гальмування зростання кореня [258].

На процеси ризогенезу впливає ендогенне співвідношення ауксинів і цитокінів. Специфічність реакції рослин по відношенню реакції на ауксини різної хімічної будови визначається відмінностями поглинання й метаболізації цих сполук. Також будова ауксинового акцептора в рослин може бути різною [31, 32, 35].

Отже, з усього вище викладеного можна зробити висновок, що дослідження, які ведуться в цій галузі цьому напрямі та практичне використання фітогормонів для покращення регенераційного процесу технологій клонального мікророзмноження є досить перспективними. Як регулятори росту рослин також можна використовувати синтетичні аналоги і застосовувати такі фітоактивні сполуки в різноманітних галузях біотехнології, фізіології рослин та насінництві.

***Фітогормональна природа асинхронного розвитку регенерантів під час МКР.*** На всіх етапах онтогенезу вищих рослин відбувається регуляція процесів росту, морфогенезу та функцій рослинного організму. Постійна перебудова їх зв'язків забезпечує виконання програми генотипу [164]. Досить важливе значення в цих процесах належить впливу корелятивних взаємозв'язків на регенерацію, розвиток регенерантів та їх різноякісність.

Наприклад, за використання експлантами бруньок (хоста, гладіолус, бузок) спостерігався їх верхівковий ріст, та внутрішньо брунькове гілкування [161, 250, 251, 252]. У результаті цих процесів утворювались складні аксиллярні комплекси, в межах яких зародки бруньок відрізнялись різним

ступенем диференціації. Множинне закладання метаморфоз них бруньок (цибулин) *in vivo* було відмічено також у тюльпана [203].

В дослідженнях з *Arnica foliosa* Nutt. встановлено, що середня кількість мікропагонів на експлант, які характеризували його регенераційну здатність, залежала від місця розташування сегмента на стеблі. Так, сегменти базальної частини регенерували в два рази більше мікропагонів, ніж верхівка, і в 1,5 рази більше, ніж сегменти середньої частини стебла [63]. Окрім неоднакового розвитку бруньок відмічався вплив походження живців на ризогенез. Наприклад, для *Plex aquifolium* найкраще вкорінення і найбільша та загальна довжина коренів характерні для верхівкових живців [84].

В культуру *in vitro* види рослин переважно вводять з використанням меристем або живців із бруньками, регенерація яких детермінується станом та розміщенням меристем (бруньок) на пагоні вихідної рослини. Меристемами, ізольовані з бруньок, що розташовані в різних частинах стебла, відрізняються між собою [109]. Так, меристемами з верхівки пагона картоплі (рис. 1.3.), порівняно із іншими, мали більші розміри, а експланти, що ізольовані із зачаткових бруньок під верхівкою пагона – найменші. Меристемами сформованих бруньок, що розташовані в середині стебла, за формою схожі на меристемами з верхівкової бруньки, але дещо менші.

Різні за походженням та формою вони мають неоднакові регенераційні властивості *in vitro*. Найбільше приживаються і регенерують рослини меристемами верхівкових бруньок (70-90 %). Найменша регенераційна здатність спостерігається в меристемі з недорозвинутих бруньок біля верхівки пагона (40-60%) [109].

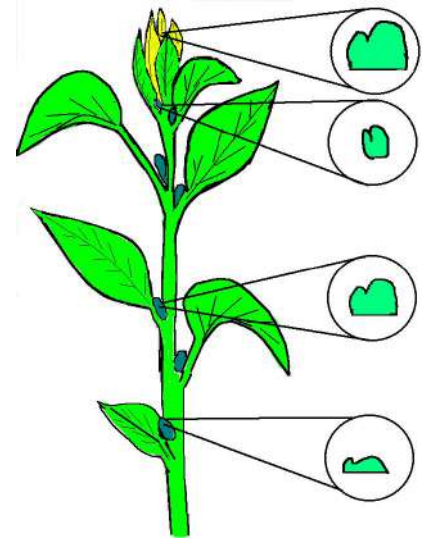


Рисунок 1.3. – Форма та розмір меристем картоплі залежно від розміщення на стеблі

У випадках регенерації рослин *in vitro* з бруньок останні, подібно до меристем, також нерівноцінні між собою за регенераційною здатністю, однак, порівняно з меристемами, вони швидше формують рослини [131].

Звичайно, на цей процес впливають і сортові особливості тієї чи іншої культури. Так, в Інституті картоплярства НААН (2000-2004 рр.) під час аналізу ефективності культури меристем картоплі встановлено вплив сортових особливостей (генотипу) на регенераційну властивість таких експлантів. Залежно від сорту вихід регенерантів знаходиться в межах від 27 до 98 %. Регенеровані рослини картоплі різних сортів за однакових умов розвивались по-різному. Так, висота рослин обумовлювалась генотипом і за 30 діб культивування *in vitro* становила від 45,5 мм у сорту Либідь і до 123,7 мм у сорту Агрія, тобто різниця за висотою становила майже три рази. Сорткові особливості в умовах *in vitro* також впливали на ріст і розвиток листків, кількість та довжину міжвузлів, товщину стебла, утворення і ріст коренів, початок та інтенсивність столоно- та бульбоутворення [109]. Отже, синтез та транспорт гормонів детермінує як розвиток всієї рослини так і окремих її органів.

***Використання гіберелінів спільно із цитокінінами в культурі тканин.*** Про взаємовплив гормонів в науковій літературі наведено багато експериментальних даних [72, 92; 98, 92]. Відомо, що цитокініни прискорюють ріст ізольованих органів [27, 72]. Але обробка інтактних рослин цитокінінами в більшості випадків спричиняла інгібування їх росту [315]. Тому, для кращого розуміння причини протилежної реакції рослинних експлантів і рослин на цитокініни необхідно враховувати їх взаємодію з іншими фітогормонами.

Наприклад, ефект ендогенного цитокініну визначається балансом між його активною дією на процеси, що відбуваються в пагоні, та інгібуючою дією на корені. Кудоярова Г.Р. з колегами [90], а також [293]. та ін. пояснюють це зниженням надходження ауксинів у корені, викликане цитокінінами. У випадку низьких концентрацій цитокініну (БАП) вони



спостерігали домінуючу дію гормону на ріст пагонів, що призводило до накопичення біомаси цілою рослиною. Але в випадку високих концентрацій інгібірування росту коренів призводило до зниження швидкості росту цілої рослини.

На взаємодію гормонів впливає ряд інших факторів [72, 92, 147], зокрема й мінеральне живлення [78]. Так, вплив гіберелінів (ГК<sub>3</sub>) на вміст цитокінів сильніше проявлявся за додаткового внесення азоту, тоді як у АБК зростає за нестачі цього елемента. Це може бути пов'язано з наявністю спільних попередників в біосинтезі цитокінінів і АБК [76]. Як наслідок вплив гіберелінів на співвідношення цитокінінів і АБК змінюється по-різному, залежно від рівня живлення.

Як стверджував академік М. Х. Чайлахян (1963), відкриття гіберелінів змусило заново переглянути теорії росту та розвитку рослин, дію світла на рослини, теорії генетичної та фізіологічної карликовості, ростових кореляцій, загального морфогенезу рослин [245]. Гібереліни, порівняно із цитокінінами та ауксинами рідше використовуються в культурі рослинних тканин. У деяких випадках гіберелову кислоту вносять в середовище разом з ауксинами і цитокінінами для культури пагонів, особливо на ранніх стадіях, для ініціації росту експлантів, взятих із зрілих частин деревних, а також для поліпшення росту й збільшення кількості пагонів, наприклад троянди і камелії [98].

**Отруєння регенерантів етиленом.** Під час культивування ізольованих органів, тканин і клітин рослин утворюється етилен [98]. Етилен або етен ( $H_2C = CH_2$ ) найпростіший і найважливіший представник ряду ненасичених вуглеводнів з одним подвійним зв'язком. Етилен — безбарвний газ із слабким приємним запахом [59]. Вперше фізіологічний ефект етилену (етену) в 1901 р. відкрив Д.Н. Нелюбов і довів його вплив на рослину. Він виявив, що етилен гальмує ріст стебла в довжину, одночасно зумовлює його потовщення. Викликані етиленом зміни в процесах росту не мають постійного характеру. Якщо етилен видаляли з атмосфери, то нормальний ріст відновлювався [164]. Етилен гальмує ріст, прискорює старіння. На

виробництві його використовують для дозрівання зелених плодів (1 об'єм газу на 1000 об'ємів повітря), дефоліації бавовнику, подовження спокою бульб картоплі і коренеплодів [59].

Внаслідок обробки пагонів малини донорами етилену відбувалось підвищення морозостійкості бруньок і всіх тканин, яке виникало за рахунок перебудови вуглеводневого і амінокислотного обмінів [49].

Водночас, існує ряд негативних ефектів використання гормонів для виробництва. Зокрема, під впливом ретардантів різної хімічної будови відбувається зменшення вмісту ІОК і активність гіберелінів у тканинах наростаючого пагона, що призводить до інгібування його меристем і зменшення атрагуючого потенціалу органу. Етиленпродуценти (кампозан, декстрел, 2-ХЕФК) при застосуванні їх у ювенільну фазу розвитку викликають зменшення розмірів і маси вегетативних органів рослин. Під впливом хлорхолінхлориду і етиленпродуцентів відбувалось зменшення вмісту хлорофілів, в першу чергу хлорофілу "b", на ранніх етапах розвитку рослин. У основі зниження інтенсивності фотосинтезу за дії ретардантів відбувалось зміщення гормонального балансу в бік накопичення АБК [96].

Етилен продукує сама рослини із метіоніну через S-аденозилметіонін. Інтенсивність його синтезу збільшується в умовах стресу [282], під час старіння культур [294]. Синтезують етилен всі частини рослини. Є дані, що ІОК індукує синтез ферменту, який відповідає за утворення попередників етилену.

Синтез етилену відбувається швидко. Так, зокрема, встановлено, що стеблові експланти в перші години після живцювання інтенсивно поглинають  $O_2$  та виділяють  $C_2H_4$  і  $CO_2$  [52]. У щільно закритих або заклеєних парафільмом посудинах концентрація етилену різко зростає [292].

Одна із функцій цього гормону у рослині – стимулювання процесів дозрівання, гальмування процесів поділу клітин. Етилен збільшує проникність цитоплазми і тим самим полегшує надходження кисню до клітин, а у випадку *in vitro* етилен як і надлишок цитокінінів спричинюють

гіпергідратацію регенерантів. Для усунення дії або синтезу цієї речовини застосують ряд прийомів. Так, за вирощування експлантів картоплі ефективним є додавання кінетину, вуглекислого газу або перманганату калію [311]. У процесі МКР підщепи черешні (Гізела 5) ефективними інгібіторами етилену виявились  $\text{CoCl}_2$  та  $\text{AgNO}_3$  [150].

### 1.5.2. Трофічна детермінація онтогенезу регенерантів

Основний регуляторний механізм онтогенезу – реалізація на різних стадіях розвитку організму генетичної програми (спадкової інформації), що є в кожній клітині. Ця програма здійснюється частково: розвиваються ознаки і властивості для яких є сприятливі умови. Окрім гормональної регуляції онтогенезу важливе значення займає трофічна регуляція. Досить часто вона носить не тільки якісний, але й кількісний характер. Співвідношення асимілятів, макро- і мікроелементів впливають на процеси росту і розвитку рослини. Важливими регулюючими факторами є не тільки вміст в середовищі тих чи інших компонентів а й те наскільки вони доступні.

Як відомо, в природних умовах система живлення рослин двохкомпонентна: повітряне живлення в основному листками, а поглинання води і розчинених мінеральних речовин – корінням. Відповідно, існує кореляційна залежність між фотоасимілюючими органами і кореневою системою. Корінь потребує постійного притоку асимілятів від листків. У свою чергу, ріст пагонів залежить не лише від притоку води і мінеральних речовин, а й від надходження специфічних метаболітів, які синтезує коренева система [164].

В умовах *in vitro* корелятивні зв'язки піддаються впливу ряду факторів, це зокрема:

- в результаті поділу рослини на сегменти для живцювання та інших операцій руйнується співвідношення між частинами організму;
- вбирання «замінників фотоасимілятів», наприклад, екзогенної цукрози відбувається або всією поверхнею об'єкта, або базальною частиною пагона,

чи кореня. Тобто, в природних умовах переважає базапительний рух а *in vitro* від може мати акропетальний чи дифузний напрям.

Тому, через особливості асептичних культур, і першу чергу гетеротрофного живлення трофічні детермінанти, порівняно із умовами *in vivo*, мають свої особливості впливу як на метаболізм, так і онтогенез рослинного об'єкта.

**Мінеральне та вуглеводневе живлення.** Мінеральні компоненти живильних середовищ. Рослинні організми поглинають із середовища необхідні поживні елементи, які залучають в складні метаболітичні процеси. У асептичних умовах іони мінеральних солей можуть надходити в рослини як з водної фази живильного середовища, так і в результаті обмінних процесів, які відбуваються на поверхні тканин, що контактують із середовищем. За надходження в рослинний організм одні мінеральні елементи використовуються у формі вільних іонів, інші зв'язуються з органічними сполуками, або включаються в ці сполуки лише після ряду окисно-відновних перетворень [152]. У результаті складних фізіолого-біохімічних реакцій підтримується структура і функціонування клітин, тканин, органів, цілісного організму. Тому, дефіцит будь-якого необхідного елементу негайно зумовлює зміни в багатьох метаболітичних циклах [164].

Склад живильного середовища вагомий детермінант онтогенезу об'єктів МКР. До його складу входять мінеральні макро- і мікроелементи та органічні сполуки. Завдяки штучним живильним середовищам *in vitro* поєднується мінеральне, гетеротрофне та автотрофне живлення. Таке живлення має свої особливості, але, водночас, має спільне із розвитком рослин в польових умовах і піддається, на нашу думку, тим же законам агрохімії, які сформульовані для рослин *in vivo* [2]:

- закон оптимального поєднання всіх факторів росту (вологи, елементів живлення, повітря, тепла, світла тощо);
- закон незамінності і рівнозначності факторів;

- закон обмежувальних факторів, коли недостатня величина одного з них, наприклад, температури, обмежує надходження елементів живлення в рослину;
- закон мінімуму, який означає, що нестача доступного елемента живлення в ґрунті зменшує ефективність інших елементів;
- закон максимуму – надлишок доступного елемента зменшує ефективність інших елементів.

Закони мінімуму і максимуму охоплюють два протилежні аспекти які М.М. Городній із співавторами [2] пропонують об'єднати в закон рівноваги мінеральних елементів. І найкоротше формулюють його так: надлишок і нестача шкідливі.

Незважаючи на те, що прописи живильних середовищ розпочали розробляти ще в першій половині минулого століття, до нинішнього часу не існує оптимального середовища, яке б враховувало повністю вище вказані закони і вимоги рослин залежно від їх видових, сортових та вікових особливостей.

Органічні компоненти середовищ. Рослини – автотрофні організми, які синтезують органічні сполуки з неорганічних і не проявляють потреби в готових органічних сполуках *in situ* (хоча у випадку наявності в середовищі можуть їх засвоювати). Однак, в умовах асептичної культури, після вичленення з цілої рослини окремих груп тканин або окремих клітин, для вирощування на штучних живильних середовищах, як правило, вони не синтезують всіх органічних сполук, необхідних для нормальної життєдіяльності організму. Тому, органічні речовини є обов'язковими компонентами культуральних середовищ [152].

Метаболізм вуглеводів займає найважливіше місце в основному обміні речовин вищих рослин. Що стосується культури тканин рослин, то вона, в нинішньому її вигляді, без включення до складу живильних середовищ різних форм вуглеводів, є неповною. Більше того, сам факт нагромадження біомаси, за винятком фотоавтотрофних методів, тісно пов'язаний з наявністю

й кількістю вуглеводів у живильному середовищі. Однак, зв'язок процесу росту культури з вуглеводним метаболізмом глибокий і складний. Для розробки основ раціонального культивування клітин, ізольованих тканин і рослин як для експериментальних цілей, так і для вирішення ряду практичних завдань, необхідне знання шляхів метаболізму вуглеводів, їхнього контролю й регуляції. Найефективнішим джерелом вуглецю для культур клітин і тканин найчастіше є сахароза. Частина утвореної сахарози у процесі гідролізації легко перетворюється в глюкозу і фруктозу, які використовуються в різних метаболічних процесах рослини. Легкість взаємних перетворень глюкози, фруктози й сахарози забезпечує залучення кожного з цих головних компонентів для росту ізольованих культур і включення в основні шляхи дихальних перетворень гліколітичний та пентозофосфатний. У цілому, використання вуглеводів через гліколіз більше відповідає високим енергетичним витратам, а пентозофосфатний шлях краще відповідає синтетичним запитам [67].

Рослинні культури не можуть синтезувати *in vitro* необхідну для їх нормального розвитку кількість вуглеводів, тому в культуральні середовища сахарозу додають в концентрації 20-30 г/л, що рекомендовано для більшості прописів живильних середовищ. Відомо, що змінюючи рівень сахарози, можна істотно впливати на характер морфоутворювального процесу, особливо в результаті взаємодії з регуляторами росту. Більше того, наявність сахарози (або інших її похідних) у середовищі необхідна для укорінення рослин-регенерантів, оскільки за її відсутності, навіть наявність ауксину ІМК не забезпечує успішного проходження процесу ризогенезу у більшості культур, а тому він істотно уповільнюється, або припиняється [152].

Органічні добавки, і в тому числі вуглеводи, також впливають на осмотичний тиск середовища [98, 273]. Крім цього, концентрація сахарози детермінує онтогенез рослин. Зокрема, від умісту сахарози залежать особливості онтогенезу рослин. За концентрації 1-2 % рослини не утворюють

мікробульб у картоплі, а додавання вже 4 і більше відсотків стимулює бульбоутворення *in vitro* [53, 109].

**Гіпергідратація рослинних тканин.** За МКР у деяких культур спостерігається феномен – гіпергідратація (вітрифікація). Це утворення *in vitro* деформованих крихких органів, які виглядають просякнутими водою [98]. Існує декілька причин вбирання клітинами надлишкової води. Зокрема, це високий уміст іонів амонію, який веде до інтенсивного утворення осмотично активних амінокислот. Таку дію можна усунути перенесенням культур на середовище, де переважає нітратна форма азоту [316].

Надмірна проникність клітинних мембран та стінок може бути викликана зміною кислотності середовища [178]. Ще вітрифікацію обумовлює використання високих концентрацій цитокінінів. Наприклад, за розмноження *Prunus cerasifera* оптимальною виявилась присутність 1,78-6,6 мкМ БАП, тоді як після підвищення концентрації БАП до 22,2 мкМ відбувалось обводнення пагонів, що в подальшому призводило до їх загибелі [102]. Гіпергідратація також можлива як реакція рослин на травматичний шок [229].

Як один із методів захисту від гіпергідратації та збереження високого коефіцієнта розмноження Н.А. Вечернина із співавторами [31]. застосовували наступний підхід: впродовж двох тижнів пазушні бруньки вирощували на середовищі з 20,0 мкМ цитокініну ізопентіладеніну, а потім переносили на середовище із пониженою концентрацією цього гормону.

**Концентрація водневих іонів у живильному середовищі.** Водневий показник (рН) – величина, що засвідчує міру активності іонів водню (H<sup>+</sup>) в розчині, тобто ступінь кислотності або лужності цього розчину. Для розведених розчинів можна користуватись терміном «концентрація» замість «активність» у цьому визначенні. рН нейтрального розчину становить 7,0. Розчини із більшим значенням водневого показника є лужними, а меншим – кислими [328].

Засвоєння елементів живлення залежить від кислотності. Одні елементи є менш доступними в слабо кислому середовищі інші в нейтральному або в слабо лужному. Майже всі хімічні реакції, що відбуваються в живих клітинах, суттєво залежать від рН. Навіть, невелика зміна кислотності може призвести до сильно виражених змін у цих процесах. Це справедливо не тільки для багатьох реакцій, в яких безпосередньо задіяні іони  $H^+$ , а й для інших, оскільки більшість біомолекул, зокрема ферменти, містять групи здатні до іонізації. Для кожного ферменту характерне певне оптимальне значення рН, за якого найефективніше приєднується молекула субстрату і каталізується необхідне хімічне перетворення. Живі клітини підтримують рН цитоплазми, а багатоклітинні тварини і рН рідин внутрішнього середовища на сталому рівні, переважно близько 7, завдяки буферним системам [321].

Концентрація водневих іонів у живильному середовищі для рослинних об'єктів впливає на стійкість і засвоюваність його компонентів. Найчутливіші до рН фізіологічно активні речовини – гіберелова кислота, НОК, вітаміни. Від рівня рН також залежить доступність для тканин фосфатів, сполук заліза та солей важких металів. Із збільшенням рН зменшується вміст іонів водню, внаслідок чого доступний двовалентний марганець окислюється до нерозчинного чотирьохвалентного [2].

За низького рН агар не желатинізується (не твердне). Оптимальними для більшості ізолюваних тканин є середовища з рН 5,6-5,8 [98], а для культур, що еволюційно походять із регіонів з кислими ґрунтами рН живильного середовища становить близько 5,0, наприклад лохина [264, 302].

рН живильного середовища визначається співвідношенням катіонів і аніонів, типом іонів і їх пропорцією у розчині. Кислотність залежить від таких факторів, як температура, вміст неорганічних і органічних іонів та речовин, вмісту  $CO_2$ , дефіциту поживних речовин (наприклад, Р-дефіцит може спричинювати зниження рН), виду рослин, стадії росту рослин. Добові коливання рівня рН відбуваються в результаті зміни розчинності  $CO_2$  [98].



Кислотність середовища змінюється впродовж періоду культивування рослин. Так, поглинання різних форм азоту впливає на кислотність середовища. Ефективне надходження нітратів має місце у кислому середовищі. Воно супроводжується виділенням аніонів із рослини, в результаті чого середовище стає менш кислим. І навпаки, в процесі поглинання амонію з клітин у середовище виділяються протони ( $H^+$ ), внаслідок чого воно підкислюється. Свіже середовище, як правило, має рН 5,4-5,8. Якщо в середовищі одночасно містяться іони нітратів і амонію, спочатку відбувається швидке поглинання амонію, що знижує рН середовища до 4,2-4,6. За цих умов засвоєння амонію припиняється, але стимулюється поглинання нітратів, унаслідок чого рН підвищується [98].

Інколи за тривалого культивування деяких видів, з часом може відбуватись підкислення культурального середовища, що негативно впливає на темпи росту. У цьому випадку необхідно перевірити кислотність відпрацьованого середовища, і якщо зсув дійсно відбувся, то потрібно частіше проводити пасажування [284].

Щоб підтримати постійне значення рН у прописи живильних середовищ вводять буферні суміші (фосфати натрію, калію і карбонат кальцію) та хелат заліза. Також є повідомлення, що на середовищах з активованим вугіллям концентрація водневих іонів за тривалого культивування тканин або рослин не змінюється. Хоча відразу при додаванні активоване вугілля підвищує рівень рН [98].

Для корекції кислотності використовуються розчини КОН або NaOH (для підлуження) або соляної кислоти (для підкислення). Коректування проводять перед автоклавуванням під час активного перемішування середовища, постійно контролюючи значення рН, і за необхідності додаючи по краплям вказані вище розчини. Коректуючи рН, необхідно дещо завищувати рН, тому, що під час автоклавування відбувається невеликий зсув в кислу сторону (~ на 0,5) внаслідок утворення органічних кислот [154, 284].

### 1.6. Сомаклональна мінливість

У процесі МКР видимих морфологічних відхилень не повинно бути. Генетична стабільність ізолюваної культури спостерігається після багатократних пасажів, що відкриває можливості збереження рослинного генофонду. Наприклад, в Інституті картоплярства НААН деякі сорти картоплі підтримуються десятки років *in vitro* в колекції [109].

Клітина, переведена в умови культивування *in vitro*, зберігає свою генетичну інформацію про цілий організм і за наявності відповідних умов може реалізувати її. Проте, фізичні та хімічні фактори культивування можуть спричиняти мутагенну дію. Цьому також сприяє генетична гетерогенність соматичних клітин експланту, що створює передумови для появи генетично змінених рослин. У основі феномену сомаклональної мінливості лежать складні процеси структурної і функціональної перебудови генетичного апарату клітин [79].

Термін “сомаклональна мінливість” [297] вперше було запропоновано для позначення фенотипової мінливості серед рослин-регенерантів, отриманих від культивованих тканин. Однак з часом він набув ширшого значення і на сьогоднішній день застосовується для позначення будь-яких генетичних або епігенетичних змін в культурі *in vitro* [17].

Генетична стабільність отриманого *in vitro* посадкового (насінного) матеріалу залежить від методу МКР. Якщо розмноження пов'язане з проліферацією пазушних та верхівкових меристем їх генетична стабільність зберігається за культивування в умовах, що інгібують формування калюсу. В випадку використання середовищ, що стимулюють утворення калюсу проявляється генетична варіабельність [29].

Під час розмноження рослин у спосіб калюсної культури завжди існує ймовірність одержання форм не ідентичних вихідному генотипу в результаті генетичної нестабільності калюсних клітин. Сомаклональна мінливість проявляється в клітинах, тканинах та органах рослин у виді як кількісних, так і якісних мутацій, цитологічних порушень, зміни послідовності ДНК,

активації та припинення експресії генів [17, 168]. У зв'язку з цим, передбачається цитогенетичний і ПЛР-аналіз отриманих рослин-регенерантів для встановлення їхньої подібності до рослин-донорів.

Наприклад, у результаті соматоклональної варіабельності серед регенерантів *Hosta L.*, отриманих в культурі верхівок пагонів, число змінених форм сягало 43,8% [168]. Більшість таких соматоклонів мали відмінності за площею листя, вмісту хлорофілу та довжині черешків. Разом з тим, генетично стабільні калюсні культури для деяких видів відомі, що не виключає можливість їх мікророзмноження на основі індукції морфогенезу в культурі калюсних тканин (наприклад, *Onobrychys. Pallasii* [208]).

Генотипові зміни з однієї сторони мають практичне значення в селекції, оскільки є джерелом генетичної різноманітності. З іншого боку, соматоклональна мінливість зумовлює труднощі, пов'язані з насінництвом, в тому числі і МКР.

### **1.7. Постасептична адаптація рослин *in vitro***

**Загальні відомості.** Адаптація рослин-регенерантів до умов вирощування *ex vitro* є завершальним етапом МКР. У сучасних дослідженнях з культурою рослинних тканин процес перенесення рослин-регенерантів у природне середовище виділяють як окремий етап морфогенезу [98]. Недосконалість технологічних прийомів на даному етапі суттєво знижує ефективність розмноження їх *in vitro*, а тому необхідно удосконалювати процес адаптації регенерації як поодиноких цінних екземплярів так і за масового промислового виробництва. Проблеми, пов'язані з цілим рядом анатомічних і фізіологічних особливостей регенерованих рослин, яких вони набули *in vitro* формуючи специфічний культуральний фенотип, пов'язані в першу чергу з особливостями листків рослин [57, 318].

Культитивування *in vitro* обумовлює зміни в кількостях і співвідношеннях фітогормонів, ферментів. Це, в свою чергу, впливає на хід метаболічних реакцій і, відповідно, утворення та діяльність органів рослинного організму.

У склі за стабільних вологості і температури рослини формують ніжні невеликі листки, тонкі стебла та слабо розвинуту кореневу систему. Такий розвиток листків спричиняється обмеженнями культуральної ємності, зміненим життєвим простором та відсутністю крайньої потреби у фотосинтезі. Це пов'язано з гетеротрофним живленням, хоча частково проявляється й автотрофне. Поєднання таких двох типів живлення ще називають як міксотрофне живлення. Тобто, за культивування на штучному живильному середовищі забезпечується змішане (міксотрофне) живлення, в якому присутнє гетеротрофне, за рахунок екзогенних вуглеводів, та автотрофне, завдяки процесу фотосинтезу. Однак культуральні ємності для дотримання стерильності закривають пробками (кришками, фольгою і т.п.) а наявний вуглекислий газ швидко вичерпується, тому відбувається інгібування автотрофного живлення і перехід до гетеротрофного в зв'язку з наявністю в середовищах сахарози чи інших вуглеводів [38].

Встановлено, що поглинання  $^{14}\text{CO}_2$  після трансплантації рослин в умови *ex vitro* посилюється тільки в новоутворених листках, тоді як у листках, сформованих рослиною в умовах *in vitro*, інтенсивність поглинання майже не змінюється [329].

Як вже згадувалось, за МКР регенеранти мають ознаки ювенільності. Відомо, що ювенільні рослини більш уразливі до несприятливих умов. Так, на ранніх стадіях розвитку рослин пшениці (II-III етапи органогенезу) виявлено вищу чутливість пігментного комплексу до стресового впливу зневодненням. Це, очевидно, обумовлено тим, що на початкових фазах онтогенезу світло поглинаюча система листків ще тільки формується і не має ефективних механізмів протистояння стресам [43]. Необхідно зазначити, що ступінь стійкості пігментів до дефіциту вологи знижується в наступній послідовності: каротиноїди  $\rightarrow$  хлорофіл *b*  $\rightarrow$  хлорофіл *a*. У слабостійких до посухи сортів пшениці Київська 7, Веселка і Білоцерківська 18 в умовах водного дефіциту зафіксовано зростання кількості каротиноїдів. Це пов'язано з тим, що однією з функцій каротиноїдів є захист хлорофілів від руйнування

та регуляція активності фотосинтетичного апарату продуктами їх розпаду [43, 160].

Відомо, що хлорофіли є носіями адаптивних властивостей фотосинтезувальних структур рослин за несприятливих умов довкілля. Виявлено також закономірну зміну кількості хлорофілу в листках у ході онтогенезу рослини на різних стадіях їх розвитку та по довжині листка [172]. Вважають, що співвідношення ауксини/абсцизини визначає динаміку фотохімічної активності хлоропластів та інтенсивності фотосинтезу в онтогенезі рослини [196].

В хлоропластах функціонує антиоксидантна система, яка пов'язана з фотосинтезом [318]. Активність і направленість процесів, що мають місце в хлоропластах, визначають характер життєдіяльності рослини, його реакцію на вплив ряду екологічних факторів [16].

Головна вимога адаптивного періоду – наявність вологи, яка забезпечує невисокий рівень фізіолого-біохімічних процесів і не призводить до їх розбалансування в наземній та підземних частинах, між якими вже склалась певна кореляція. Культуральний фенотип визначається також особливостями кореневої системи. Рослини *in vitro* не мають стимулу формувати добре розвинену кореневу систему. Причин – розміщення коріння в штучних живильних середовищах, забезпечених легкодоступними вологою та елементами живлення. Але для росту й розвитку регенерантів під час адаптації необхідні мінеральні речовини, за надходження яких відповідальна коренева система. У тих випадках, коли після обробки ауксинами в мікроживців з'являється калюс й формуються товсті корені, то, як правило, між корінням та пагонами відбувається поганий судинний зв'язок. У бокових тканинах, що формуються, відбуваються зміни в провідній системі і гіпертрофія кортикального шару. Нормально утворені корені регенеруються без утворення калюсу [318]. Коренева система утворена *in vitro* часто характеризується відсутністю корневих волосків та коренів другого порядку. Через це корені мають невелику площу живлення й слабку поглинальну

здатність, що також негативно проявляється на етапі їх адаптації до нових умов росту [31, 32]. Також на фенотип *in vitro* впливають такі умови: вологість повітря, яка *in vitro* близька до насиченої, відсутність градієнту водного потенціалу між випарувальною поверхнею листа і атмосферною вологістю, що призводить до інгібування транспірації, яка є рушійною силою верхнього кінцевого двигуна, а відповідно й системи дальнього транспорту. Останнє викликає зниження водоутримуючої здатності листків регенерантів за рахунок відсутності функціонування продихів, погано розвинутої кутикули та зниженого осмотичного потенціалу. Таким чином пристосування до специфічного комплексу факторів *in vitro* викликає адекватні реакції рослин. Але в звичайних умовах, після пересадки регенерантів *ex vitro* без адаптації такі пристосування виявляються шкідливими тому, що відбувається незворотне зневоднення рослин-регенерантів [38].

**Особливості переходу рослин з *in vitro* в *in vivo*.** Після розмноження рослини *in vitro* їх необхідно підготувати до переходу на автотрофне живлення за пересадки на субстрат. Для цього їх, як правило, розміщують на середовищах із зменшеним умістом вуглеводів, мінеральних елементів та додають ауксини, необхідні для індукції коренеутворення. Цей перехід з асептичних умов в *in vivo* без адаптації часто супроводжується в'яненням та загибеллю рослин, непристосованих до умов відкритого ґрунту. Так, зокрема, пересадка рослин з стерильних стабільних умов в нестійкі умови *in vivo* спричинює серйозні проблеми з водним обміном рослин. Це пов'язано з рядом мофологічних змін рослин *in vitro*: мала кількість кутикулярного воску та слаборозвинута хлоренхіма; слабка автотрофна активність; зміни в роботі продихового апарату, що призводить до різких втрат води [61, 62].

Відбуваються зміни і в гормональному статусі регенерантів. Якщо в ювенільних рослин переважають цитокініни й ауксини над абсцизінами, то після потрапляння в несприятливі умови *in vivo* зростає кількість останніх [218, 219]. П. Ворінг [343] вважає, що абсцизова кислота необхідна для

підтримання оптимального водного балансу і попередження надлишкових втрат води.

Доведено, що в рослинах картоплі накопичення значної кількості абсцизової кислоти за водного стресу корелює з розвитком посухостійкості та залежить від сортових особливостей. Так, у листках картоплі сорту Темп у фазу цвітіння під час посухи відбувалось зміщення фітогормонального балансу в бік переважання синтезу АБК, порівняно з індоліл-3-оцтовою кислотою, зеатином і зеатинрибозидом. Встановлено, що посуха індукувала зростання кількості глутаміну і, особливо, аспарагіну в листках і бульбах. При цьому, слабо стійкі до посухи сорти містили більшу кількість амідів, ніж стійкі. Обробка рослин регуляторами росту індукувала зменшення кількості амідів у листках картоплі [172].

Поступове зневоднення пагона обумовлює зростання рівня АБК в коренях [157, 312]. Окрім впливу на продихи відома стимулююча дія цього гормону на водну провідність коренів [197]. Накопичення АБК часто співпадає із зменшенням умісту цитокінінів, а, як відомо, ці гормони є антагоністами в процесах регуляції інтенсивності транспірації [262, 312].

Адаптацію рослин *in vitro* до нестерильних умов найчастіше проводять у спорудах штучного клімату (кліматоканери, фітотрони, гідро- та аеропонні установки), що дозволяє створювати навколо рослини *ex vitro* необхідний мікроклімат. Поступово впродовж 30-50 діб параметри мікроклімату (температура та вологість повітря, інтенсивність освітлення) наближаються до умов *in vivo*. Також змінюють режими мінерального живлення. Наприклад, для *Rhododendron hybridum* у перше підживлення для стимуляції ризогенезу рекомендують збільшений вміст фосфору, а за другого – збільшують вміст азоту, щоб стимулювати розвиток асиміляційної поверхні пагона [57].

Під час адаптації крім параметрів мікроклімату надзвичайно важливим є субстрат, на який висаджується рослина, перенесена з штучного живильного середовища. Основні вимоги до цих субстратів такі:

- вміщувати в собі одночасно велику кількість доступної вологи та повітря;
- довговічність;
- безпечність для навколишнього середовища в процесі приготування;
- придатність для стерилізації;
- не засолюватись і легко промиватись від надлишку солей;
- дешевизна і низькі затрати на експлуатацію.

Субстрат діє на рослину як прямо, так і опосередковано, що проявляється через режим живлення. Різні водно-фізичні властивості субстрату обумовлюють неоднакове поглинання мінеральних речовин, а це означає, що необхідно підбирати різні режими мінерального живлення і поживні розчини.

Види субстратів. Усього в світі поширеними є більше 20 субстратів (використовуються також їх суміші) що застосовуються в умовах закритого ґрунту [214]. Умовно їх можна розділити на 3 групи: органічні, мінеральні, синтетичні.

*Органічні субстрати.* До цієї групи субстратів належать замітники рослинного походження: солома, кокосовий пил, торф, виноградні вижимки, тирса і т.п. Вони відносно дешеві і після використання не потребують утилізації.

*Мінеральні субстрати.* Використовуються або самі мінерали (щебінь, цеоліт), або продукти їх переробки (мінеральна вата, керамзит, вермикуліт, перліт). Усім цим матеріалам притаманні довговічність, висока інертність, пористість, проте не висока вологоємність [214].

*Пористі субстрати* – мінеральна вата, перліт, вермикуліт, керамзит отримують під час обробки гірських мінералів високою температурою (більше 1000 °С). Це дозволяє знищити всю патогенну мікрофлору. Субстрат після остигання запаюють у плівку і в такому стані він може тривалий час зберігати стерильність, навіть під час транспортування. Нагріваючись



мінерал розширюється, збільшується в розмірах, його внутрішня структура руйнується, після остигання він стає легким та пористим.

В Україні як мінеральний субстрат широко застосовують перліт. Отримують його в результаті термообробки (1000–1200 °С) вулканічної породи із родовищ в Закарпатті. Найбільше містить у собі оксиду кремнію ( $\text{SiO}_2$  – 68-76%). Має високі сорбційні властивості, також тривалий час зберігає стерильність, пористість, вологоємність. Одним з недоліків перліту є утворення під час вантажно-розвантажувальних робіт білого пилу та крихкість [179]. Існує повідомлення, що частинки перліту заряджені позитивно і він зв'язує негативно заряджені іони і не утримує позитивно заряджені іони, внаслідок чого змінюється їх доступність [180].

*Перенесення рослин з умов in vitro в умови in vivo* – важливий і найбільш трудомісткий заключний етап мікроклонального розмноження. Найкращим для пересаджування є період, коли в рослини добре розростається коренева система для поглинання мінеральних елементів з ґрунту, а молоді листочки вже здатні до продуктивного фотосинтезу. Рослина стає повністю автотрофною, здатна до самостійного існування, а тому її можна пересаджувати у природні умови.

Важливим аспектом роботи є вибір ґрунтового середовища, в яке переноситься рослина. Переважно це суміш торфу з піском, перлітом або вермикулітом. Наприклад, для суниць, вишні, смородини використовують суміш – ґрунт : торф : пісок = 1:1:1. [72, 147]. Перед висаджуванням у ґрунт корені рослин промивають у розчині фунгіциду (фундазол, бенлат та інші). Розміщують рослини не дуже загущено, щоб запобігти розвитку грибкових захворювань і сильному видовженню пагонів через нехватку світла. У період вирощування щотижня рослини обприскують слабким розчином фунгіциду.

Фізіологічні особливості молодих листків (відсутність захисного воскового шару), а також відсутність розвинутої кореневої системи (недостатньо закріплена у ґрунті, відсутність потужної зони кореневих волосків) не забезпечують нормального водного балансу рослин. Інтенсивна

кутикулярна транспірація не компенсується надходженням води за допомогою тиску кореневої системи, що може призвести до в'янення і загибелі рослин. Саме тому, високий рівень вологості повітря (90-100%), в якому буде знаходитись рослина «після пробірки» – найважливіший фактор перших тижнів вирощування. Для цього використовують установки туманоутворення в теплицях, індивідуальне покривання рослин поліетиленовою плівкою, нетканим волоком або скляним посудом (створення вологої камери). Як правило, високий рівень вологості підтримують до утворення нового листка впродовж двох і більше тижнів.

Потім рослини загартовують – готують до відкритого ґрунту: поступово знімають покриття з рослини і зменшують вологість до природної. Для загартування рослин, за останньої фази адаптації, приділяють увагу оптимальному живленню рослин. Надлишкове підживлення призводить до жирування рослин, вони стають надмірно рослими і погано приживаються після перенесення у відкритий ґрунт.

Якщо робота проводиться у великих масштабах, то період адаптації рослин планують і проводять з березня до вересня, щоб скоротити до мінімуму витрати. Рослини, одержані у зимовий період, зберігають у холоді (+5°...+8°) за освітлення, а весною проводять усі названі вище процедури з перенесенням в умови природного існування [147].

### **Висновки до розділу 1**

Незважаючи на все ширше використання біотехнологічних методів розмноження рослин, існуючі методи потребують удосконалення та актуальною є розробка нових методів.

На першому етапі МКР основними проблемами є глибоке контамінування експлантів та самоінтоксикація рослинних об'єктів фенолоподібними сполуками.

На другому етапі найбільш гостро стоять питання вітрифікації, підтримання гормональної та генетичної однорідності регенерантів;

технологічно ефективно застосування гормональних та трофічних детермінант онтогенезу регенерантів.

За третього етапу проблемним є синхронне коренутворення рослин.

На завершальному етапі поглибленого вирішення потребують процеси переходу рослин до автотрофного живлення та пристосування до нетипових для пробіркових рослин зовнішніх умов.

## РОЗДІЛ 2

### УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

МКР досліджували за чотирма напрямками, які відповідали складовим технологічного процесу:

- відбір, введення та стабілізація розвитку експлантів в асептичних умовах;
- мультиплікація;
- індукція ризогенезу в регенерантів;
- постасептична адаптація.

#### 2.1. Місце проведення досліджень

Дослідження проводили в міжкафедральній лабораторії біотехнології рослин Білоцерківського національного аграрного університету МОН України впродовж 2005–2017 рр., а також ТОВ «Колосія» Закарпатської області в 2018–2019 рр. та ФГ "Беррі Фарм Юкрейн" Волинської області в 2019–2020 рр.. Рослини культивували в біологічних пробірках, і в скляних банках місткістю 370 та 200 мл (рис. 2.1.)

Середовища культивували в автоклаві ВК-75 за температури 121 °С, за тиску 1,1 атм. Якщо не передбачалося іншого, застосовувалося модифіковане середовище за Мурасіге і Скугом (табл. 2.1).

Роботу в асептичних умовах проводили в ламінарній шафі з горизонтальним потоком фільтрованого повітря. Для маніпуляції рослинні об'єкти викладали на стерильні чашки Петрі і оперували за допомогою ланцетів та пінцетів стерилізованих за температури 250 °С кварцевим стерилізатором (рис. 2.2).



Рисунок 2.1 – Культивування по 5 шт. Рисунок 2.2 – Стерилізатор експлантів ожини в скляних банках ємністю кварцевий 200 мл

Таблиця 2.1 – Модифіковане середовище за Мурасіге і Скугом

Компонент	Кількість мг/л		Компонент	Кількість мг/л	
	розмнож.*	укорін.		розмнож.	укорін.
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1250	1250	$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3
$\text{KNO}_3$	1100	1100	Тіамін-НСІ	0,1	0,1
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	440	440	Піридоксин-НСІ	0,5	0,5
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	770	770	Вітамін С	1,6	1,6
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	970	970	Нікотинова кислота	1,0	1,0
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	6,2	Мезоінозит	100	100
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3	Гліцин	0,5	0,5
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	Аденін	0,2	0,1
$\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	ІМК	0,1	4,0
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	БАП	0,3	0,2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	Сахароза	30000	10000
KJ	0,83	0,83	Агар	7000	7000
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8			

Примітка: \* скороченню розмнож. відповідає розмноження, укорін. укорінення

Після маніпуляцій рослинні об'єкти культивували на освітлювальних стелажах. Залежно від схем конкретних досліджень стелажі комплектувалися лампами ЛБ-36 (рис. 2.3) (виробник ОАО «Свет», Росія), Промінь (виробник «Союз-Світло», Україна.), та діодами Jazz way (виробник «Опалтек (ГК) Лімітед» м. Коулун, Китай).



Рисунок 2.3 – Варіант комплектування освітлювального стелажу лампами ЛБ-36

## 2.2. Матеріал досліджень

В експеримент залучали рослини, які належать до різних ботанічних та життєвих форм (табл. 2.2).

Таблиця 2.2 – Рослини, залучені в дослідження

<p>Трав'янисті:</p> <p>гвоздика;</p> <p>кактус;</p> <p>картопля;</p> <p>міскантус;</p> <p>хоста</p> <p>агапантус.</p>	<p>Деревні:</p> <p>туя західна;</p> <p>ківі;</p> <p>падуб;</p> <p>фундук;</p> <p>вишня;</p> <p>слива;</p> <p>верба;</p> <p>павловнія;</p> <p>алича;</p> <p>персик та його підщепи;</p> <p>кизил;</p> <p>цитрофортунелла.</p>
<p>Чагарники:</p> <p>малина;</p> <p>троянда;</p> <p>ожина;</p> <p>смородина;</p> <p>хризантема.</p>	

### 2.3. Особливості деконтамінування

Звільнення рослинного матеріалу від контамінуючих мікроорганізмів розпочинали відмиванням із застосуванням водного розчину Твін 80 (1:20). Якщо передбачалось схемами дослідів з культурами, які самоотруюються фенольним ексудатом, у окремих варіантах застосовували розчини речовин із антиоксидантними властивостями (полівінілпіролідон, аскорбінова кислота, цистеїн). У окремих дослідях окрім гіпохлориту натрію застосовували інші деконтамінанти згідно схем дослідів. Це зокрема препарат Бланідас 300 (0,7-1,0 г на 100 мл автоклавованого дистилляту). Діюча речовина: натрієва сіль дихлорціануронової кислоти 80,52%, виробник ООО Бланідас Україна. Згідно схеми окремих дослідів після промивання ізольовані експланти замочували в розчині одного із фунгіцидів:

- Превікур Енерджі 840 SL, в.р.к. діюча речовина пропамокарб гідрохлорид 530 г/л, фосетил алюмінію 310 г/л. Виробник: Bayer CropScience (Німеччина);

- Фундазол, діюча речовина: беноміл 50%. Форма: порошок, що змочується. Виробник: "Агро-Кемі КФТ", Угорщина;
- Світч, діючі речовини: флудіоксоніл, 250 г / л; ципродиніл, 375 г / л. Виробник: Syngenta
- Максим Форте 050 FS т.к.с., діючі речовини: 25 г/л флудіоксонілу; 15 г/л тебуконазолу; 10 г/л азоксистробіну. Виробник: Syngenta

В окремих варіантах застосовували антисептик, додаючи його в живильний розчин:

- AgNO<sub>3</sub>, виробник Sigma-Adrich (ш. Міссурі, США);
- левоміцитин (д.р. хлорамфенікол, виробник ВАТ "Київмедпрепарат", м. Київ, Україна;
- гентаміцину сульфат ЗАТ "Фармацевтична фірма "Дарниця", м. Київ, Україна ;
- РРМ (Plant Preservative Mixture™) діючі речовини: 5-Chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolone 0.1350% і 2-methyl-3(2H)-isothiazolone 0.0412% виробник Plant Cell Technology, Вашингтон. США.

Після замочування в фунгіцидах експланти промивали в автоклавованому дистилляті. Потім в ламінарній шафі експланти замочували в розчині (1:20) гіпохлориту натрію (комерційний препарат «Білизна Мілам», вміст діючої речовини 30 %, виробник ООО «Завод побутової хімії «Мілам», м. Луганськ, Україна»).

Наступним кроком було трикратне промивання експлантів у автоклавованому дистилляті. Їх за потреби розділяли на менші частини, звільняли від криючих та омертвілих під час стерилізації тканин. Підготовлені експланти висаджували на живильне середовище. Під час регенерації експлантів основними показниками були: приживлюваність експлантів; утворення фенолоподібних сполук; розвиток контамінуючої мікрофлори.

На першому етапі досліди проводили із чотирикратною повторністю. На кожне повторення висаджували залежно від досліду 50-100 експлантів.



## 2.4. Мультиплікація

Розмноження і пасажування (субкультивування) *in vitro* проводили шляхом прямого морфогенезу рослин. Вихідні рослини живцювали залежно від кожного окремого дослідів в один із наступних способів (рис. 2.4):

I – поділ пагона на одно-двовузлові живці;

II – поділ конгломерату на мікропагони.

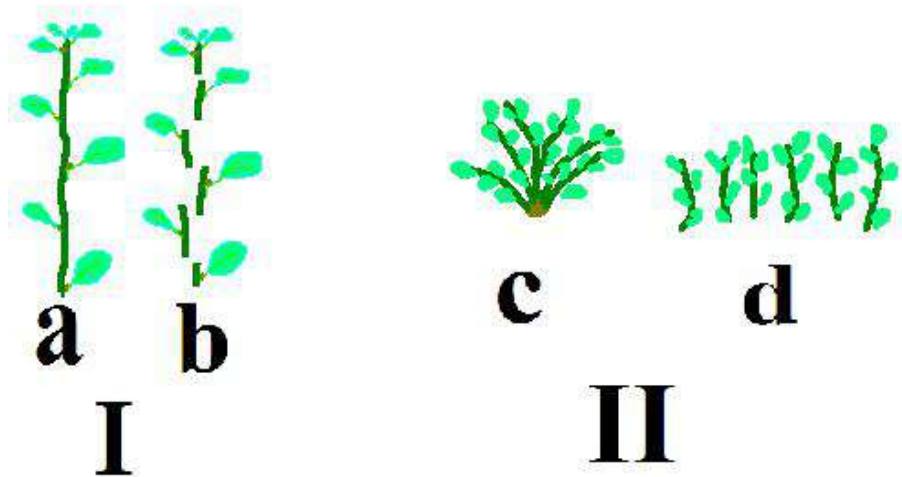


Рисунок 2.4 – Способи поділу вихідних рослин, де:  
 I – спосіб поділу на однувузлові живці; **a** - вихідна рослина із одним добре розвиненим пагоном, яка виросла за апікального домінування; **b** – однувузлові живці.  
 II – спосіб поділу конгломерату на мікропагони; **c** - вихідна рослина-конгломерат мікропагонів, яка виросла без апікального домінування; **d** – мікропагони.

За першого способу вихідні рослини *in vitro* вирощували за вмісту гормонів, який викликав апікальне домінування й розвиток одного пагона. Регенеранти для живцювання в асептичних умовах ламінарної шафи виймали з пробірок (банок) розрізали на живці, кожен із яких містив в собі відрізок стебла з листком та пазуховою брунькою. Частина стебла над листком в 2-3 рази коротша частини стебла розміщеної нижче листка.

Другий спосіб передбачав вирощування вихідних рослин на середовищах з надлишком цитокінінів (кількісне переважання цитокінінів над ауксинами), що призводило до втрати апікального домінування. Потім в цих рослин-донорів пробуджувалися бічні бруньки. За їх пробудження

утворювався конгломерат мікропагонів, який під час живцювання розділяли на окремі пагони і висаджували окремо.

На цьому етапі досліджень МКР досліди закладали із чотирьох кратною повторністю. У кожному повторенні було 30-50 облікових рослин. Висаджували 45-65 живців на кожне повторення щоб вибракувати регенеранти із механічними пошкодженнями набутими під час посадки, контаміновані та нетипові для варіанту.

### **2.5. Індукція ризогенезу в регенерантів**

Як індуктори коренеутворення досліджували наступні фактори:

- екзогенні ауксини (ІОК, ІМК, НОК);
- додавання в живильне середовище активованого вугілля;
- зменшення вмісту мінеральних елементів в живильному середовищі;
- вирощування вихідних для живцювання рослин за індукуючих ризогенез умов;
- довжина світлового дня.

Під час обліків рахували довжину кореневої системи за найдовшим коренем та кількість коренів.

### **2.6. Фотоавтотрофне мікроклональне розмноження**

Як особливий вид розмноження рослин з кращими адаптаційними властивостями проводили розмноження в спеціальних контейнерах з інтенсивним освітленням (рис. 2.6) та повітрям, збагаченим вуглекислим газом (рис. 2.7). Інтенсивність освітлення залежно від варіантів дослідів було від 2,2 кЛух до 11,0 кЛух.



Рисунок 2.6 – Контейнер для фотоавтотрофного МКР (вид зсередини)



Контейнери із газопроводами



Система контролю подачі вуглекислого газу

Рисунок 2.7 – Система подачі вуглекислого газу в контейнери з рослинами за фотоавтотрофного МКР

Використовували перлітові, вермикулітові та кокосові субстрати. Як поживні розчини застосовували мінеральні основи середовищ за Мурасіге і Скугом, Хогландом, комерційні розчини добрив фірми «Гілея». Для захисту від патогенів рослини обробляли фунгіцидами: Превікур Енерджі 840 SL; Світч; Фундазол.

Досліди проводили в чотирикратній повторності один контейнер із однією касетою виступав як одне повторення.

### 2.7. Постасептична адаптація

Після утворення кореневої системи регенеранти адаптували до умов *in vivo*. Як субстрат використовували: перліт (рис. 2.8), вермикуліт, сфагнумів торф; кокосовий субстрат; гідрогелі. В проточній культурі (гідропоніка) вирощували без субстратів (рис. 2.9, рис. 2.10, рис. 2.11). Регенеранти висаджували цілими або розділяли на живці.



Рисунок 2.8 – Живцювання регенерантів аронії чорноплідної касети на перліт-вермикулітному субстраті (1 : 1)



Рисунок 2.9 – Конструкція гідропоніки





Рисунок 2.10 – Касета та регенерант ожини вирощений гідропонним методом



Рисунок 2.11 – Піддон гідропоніки з касетою

В окремих дослідях рослини обприскували прилипачем Ліпосам (Виробник БТУ-Центр, діюча речовина – композиція біополімерів природного походження з прилиплюючими властивостями). Це проводилось для утворення плівки, щоб захистити рослини від втрати вологи.

### **Висновки до розділу 2**

Створювали оптимальні умови для вирощування пробіркових рослин та на етапі постасептичної адаптації. Вихідним матеріалом використовували трав'янисті рослини (картопля, хоста і міскантус), чагарники (троянда, ожина, малина та актинідія), деревні (туя західна, каламандин, падуб, фундук, персик, слива, верба і павловнія).

Використовували штучні живильні середовища стандартного пропису. У окремих дослідях використовували половинний його склад.

Для декантимінування застосовували розчини речовин з антиоксидантними властивостями, гіпохлорит натрію та йому подібні, фунгіциди, антибіотики.

Використовували як стандартне обладнання, так і зроблене нами.

## РОЗДІЛ 3

### ВІДБІР ТА ВВЕДЕННЯ ЕКСПЛАНТІВ У АСЕПТИЧНІ УМОВИ

Всі етапи МКР є рівноцінно важливими і технологічні проблеми на будь-якому з них зводять нанівець комерційний ефект всього технологічного процесу. Отримання морфогенної і стерильної культури перший етап, без якого не можливі наступні. Без належного деконтамінування неможливий перехід до мультиплікації. Недотримання стерильності призведе до забруднення середовища та загибелі рослинних об'єктів. Так само не можна проводити пасажування неморфогенних об'єктів.

У цілому, на першому етапі виконано наступний алгоритм аналізу проблем та удосконалення цієї частини технологічного процесу:

- походження есплантів;
- деконтамінація;
- захист від інтоксикації фенолоподібними та іншими речовинами;
- отримання стабільних морфогенних структур.

Для цього досліджено ендод- та екзогенні фактори впливу: деконтамінанти, антиоксиданти, біологічні особливості рослинних об'єктів.

#### **3.1. Приживлення експлантів залежно від їх походження**

Різні частини рослини як в межах організму, так і в часі є онтогенетично різноякісними [109], а тому проявляється неоднакова реакція різних видів експлантів на введення в асептичні умови. Викладене усугубляється також втратою інтегральних і кореляційних зв'язків, які були в цілісному організмі, та вплив деконтамінантів та зміну обміну речовин під час культивування. За морфологією експланти в дослідженнях були неоднаковими: медіальний живець пагона (наприклад, ожина, троянда); верхівка пагона; брунька (хоста); основа суцвіття (агапантус), проросток або насінина (туя західна); меристема. Відповідно вони по-різному реагували на прийоми МКР.

**Вплив строку відбору експлантів на успіх МКР.** Відрізнялись експланти за часом ізоляції їх з донорських рослин. Наприклад, порівнюючи ефективність регенерації рослин з експлантів, ізольованих у різних за станом донорів, встановили краще приживання за використання варіанту «зелений конус», який передбачав ізоляцію бруньок з материнських рослин під час їх розпускання (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Ефективність регенерації рослин роду *Rosa* L. з експлантів ізольованих з різних за станом донорів

Варіант	Прижилося експлантів, %		
	Шипшина зморшкувата	Троянда	
		Сорт Пінк фейрі	Сорт Авеланж
Глибокий спокій	0	0	0
Вимушений спокій	3±3	15±4	8±4
«Зелений конус»	28±4	44±5	13±3
Травянистий пагін довжиною 5-7 см	2±1	6±2	3±2
Бутонізація	9±6	27±4	6±4
Цвітіння	12±5	31±4	11±3
Відмирання листя	3	6	9

Тому, для подальших досліджень всі заходи з введення *in vitro* досліджуваних об'єктів були спрямовані на отримання експлантів саме в оптимальному стані. Для введення в асептичні умови донори експлантів повинні вийти із стану спокою. Часто організаційно потреба у введенні в культуру виникає коли донорські рослини знаходяться на різних етапах онтогенезу, наприклад в стані спокою. Для вирішення проблеми застосовували синтетичний фітогормон гіберелін. Визначали оптимальний спосіб його застосування: обробка материнської рослини розчином 0,1 г на 1



літр води, чи додавання гібереліну 1 мг/л в живильне середовище, в якому культивуватимуть ізольовані експланти (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Вплив способу застосування гібереліну на вихід живих стерильних експлантів, %

Спосіб застосування гібереліну	Хоста сорт Патріот, %	Троянда сорт Авеленж, %	Ожина сорт Торн Фрі, %
Контроль без гібереліну	2	2	5
Обробка материнських рослин	59	62	68
Обробка пагонів рослин-донорів	56	58	54
Додавання в живильне середовище	12	18	11
НІР <sub>05</sub>	2	2	4

Для трьох видів рослин: хоста, троянда та ожина встановили, що швидше можна отримати пробуджений експлант за попередньої обробки рослини-донора розчином гібереліну. Пробудження бруньок на живильному середовищі залежно від варіанту поступалось варіантам з пробудженням материнських рослин на 19 і більше діб. Порівняно з контролем також відмічено значно більший вихід регенерантів із пробуджених експлантів на донорі.

**Введення в асептичну культуру представників роду актинідія.** Для отримання асептичної культури первинних експлантів випробувано різні за місцем ізоляції експланти (рис. 3.1): апікальні (верхівкові) та медіальні (з середньої частини пагона). Встановлено, що їм властивий неоднаковий хід адаптації до асептичних умов та різна регенераційна здатність. Більш вираженими ці відмінності виявлені у видів *A. chinensis* та *A. Deliciosa* і менш проявились у *A. arguta*. Верхівкові експланти, порівняно із медіальними, за умов успішної деконтамінації та застосування заходів

захисту від самоотруєння фенолоподібними речовинами швидко регенерували в рослини *in vitro* (рис. 3.2).



Рисунок 3.1 – Типи експлантів за місцем ізоляції з донорної рослини жіноча форма №1 (*A. chinensis*), 25.07.2016



Рисунок 3.2 – Регенерація рослин *in vitro* *A. deliciosa* (сорт Hayward) на 30 добу культивування, залежно від походження первинних експлантів:

1- апікальні, 2 – медіальний.

Відмічено вплив термінів ізоляції експлантів на регенераційну здатність рослин *in vitro*. Так, за першого відбору (весняного), порівняно з другим (літнім), відмінність виявилась значно вираженою. До того ж, у

регенерантів першого відбору спостерігалась інтоксикація власним ексудатом. Особливо інтенсивне фенолоутворення за першого відбору було в експлантів *A. chinensis* апікального походження.

**Введення в асептичну культуру павловнії.** Оптимальним періодом для введення павловнії *in vitro* було, за нашим практичним досвідом, кінець грудня – початок січня. В цей час достатньо поставити гілки з бруньками в кімнаті з температурою 18-25 °С і через 2-3 тижні вони почнуть виходити з вимушеного спокою. Якщо потрібно пришвидшити цей процес, або ввести рослини в асептичні умови, наприклад, у листопаді, то необхідно застосовувати гібереліни. Успішним було використання на цьому етапі двох препаратів: ГК<sub>3</sub> і ГК<sub>4/7</sub> (рис. 3.3). Ізольовані бруньки після видалення покривних лусок мали задовільні темпи регенерації первинних експлантів.

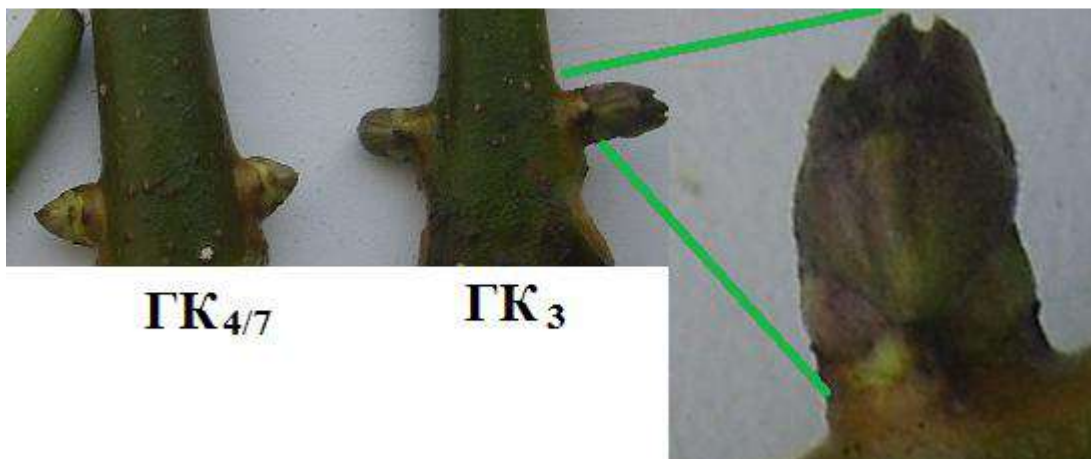


Рисунок 3.3 – Пробудження бруньок на напівздерев'янілих пагонах павловнії за обробки гіберелінами (на десяту добу після оброблення)

**Використання різних за морфологією експлантів.** Неоднакові за походженням експланти мали різний уміст пластичних, запасних і, особливо, біологічно активних речовин, а, отже, й специфічні метаболізми, які неоднаково реагували на умови *in vitro*. Зокрема, встановлено відмінності в регенерації рослин з різних експлантів (табл. 3.3). Найбільший відсоток регенерантів з пагоном та кореневою системою отримано за використання в якості первинних експлантів пагонів проростків.

Таблиця 3.3 – Вплив виду експланта *Thuja occidentalis* 'Smaragd' на регенерацію за введення в асептичні умови

Тип експланта	Регенерантів що мали, %			Морфогенез відсутній, %
	корені	пагони	корені і пагони	
меристема	8,7	13,1	16,6	57,3
стебловий живець	1,4	0,6	0,9	14,8
насіння	2,6	11,1	14,6	3,9
пагін проростка	29,2	38,7	24,1	0,8
НІР <sub>05</sub>	0,4	0,3	0,3	0,5

Найменше отримано регенерантів за використання меристемних експлантів. Із них неморфогенним виявилися 57,3 відсотки за 0,8 відсотка неморфогенних експлантів з пагона проростка. Вважаємо, що меристеми через малі розміри більше травмувались та містили, порівняно із іншими видами експлантів, менше життєво важливих структур (провідна система, системи асиміляції мінеральних речовин та вуглецевого живлення) і зон утворення гормонів [164].

Іншою у підборі типу експлантів для окремих культур постає проблема легко ізолювати експланти для подальшого асептичного культивування, а в інших з ряду причин складно виділити технологічно придатні частини організму. Наприклад, у процесі введенні в культуру агапантусу постала складність отримати стерильний морфогенний експлант. З вкороченого пагона через особливості атомічної будови (вкорочений пагін) складно ізолювати достатню кількість бруньок, а ізоляція їх з кореневища недопустима з причини сильного забруднення. Тому, проводили пошук інших експлантів. Водночас, у ботанічних видів подібних за анатомічною будовою до агапантусу, наприклад, цибулі й часнику ефективними експлантатами були тканини [72]. Для експлантів лілій [166] та тюльпанів [6] встановлено, що найбільшим морфогенетичним потенціалом наділені

квітколоже, на основі якого є меристематичні зони, які в культурі *in vitro* формують пагони [277]. Для них оптимальним періодом введення в асептичні умови є мікроспорогенез і утворення одноядерного пилку. У цей період обгортки суцвіття закриті, пиляки зелені, що і обумовлює успіх виконання дослідження. Пізніше на стадії двоядерного пилку, за розкритої обгортки і жовтих пиляків отримати регенеранти не вдається.

Як зазначалось у агапантуса через високий рівень контамінування шматочків кореневища або пагона, які містять бруньки, складно регенерувати рослини шляхом прямого морфогенезу. Тому, більш успішним шляхом виявилось отримання адвентивних бруньок із основи суцвіття в місцях прикріплення оцвіттини до квітколоже. Встановлено неоднаковий хід регенераційного процесу залежно від походження експлантів ізольованих з різних частин рослин агапантуса (рис. 3.4, табл. 3.4). Походження первинних експлантів впливало на утворення рослин-регенерантів. З основи суцвіття формувалось по одній великій рослині, тоді як з квітки, хоча і за довший період, але утворювалась більша кількість регенерантів з меншими розмірами. Сам експлант від розростання його частин розпадався на шматки. Деякі з них мали типові для цього виду листки, а інші – квіткові пелюстки, оцвіттини зеленого кольору.

За подальших ділень частина такої оцвіттини утворювала нові видозмінені квітки, а частина регенерувала мікророслини з листками. Використання таких експлантів під час введення в культуру *in vitro* агапантуса сорту Charlotte дозволило отримати 53 % живих експлантів, а ефективність деконтамінації становила 15 % за 36 % живих та ефективності деконтамінації в один відсоток на варіанті «пазушна брунька». Варіант «основа суцвіття» поступався лише за показником період регенерації: 72 доби проти 57 діб за використання пазушних бруньок. Однак, у варіанті «квітка» період регенерації був ще довшим – 93 доби.

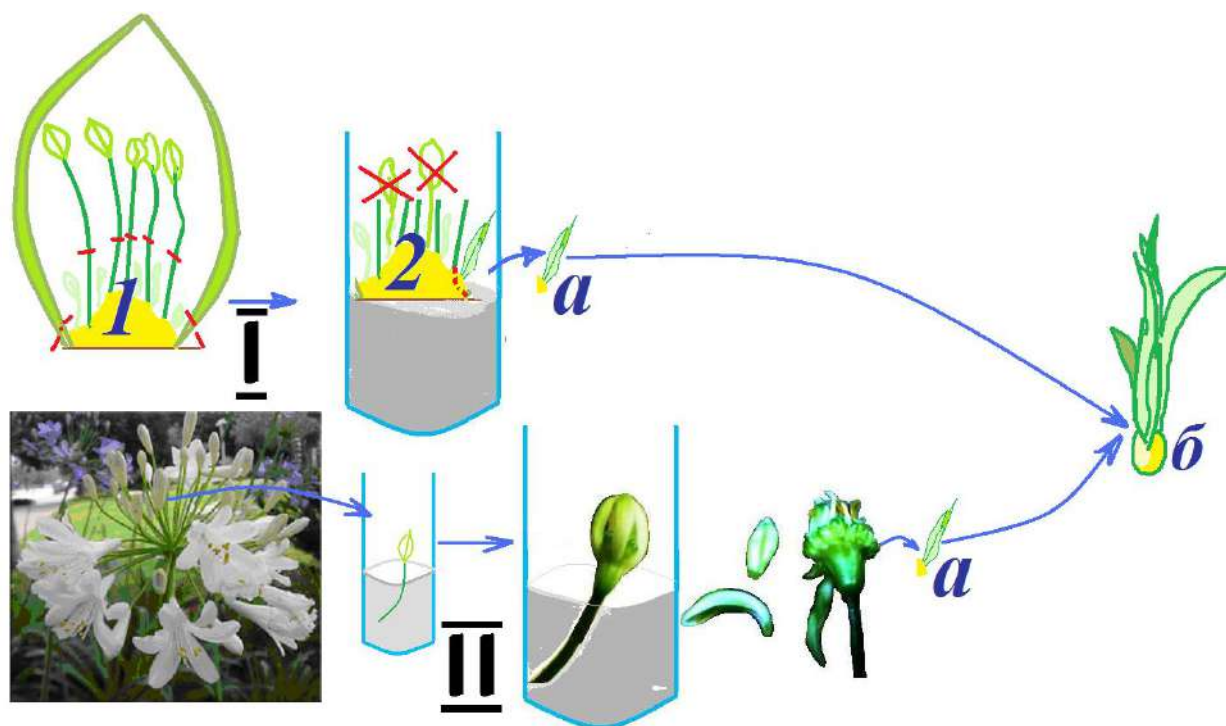


Рисунок 3.4 – Схема отримання регенерантів *Agapanthus umbellatus* із експлантів ізольованих із основи суцвіття (I) та із квітки (II):

1. Експлант перед введенням *in vitro*. 2. Асептичне культивування:
- а – утворення адвентивної бруньки; б – утворення мікророслин.

Таблиця 3.4 – Вплив типу експлантів *Agapanthus umbellatus* на їх деконтамінацію, сорт Charlotte

Тип експланта	Висаджено, шт.	Живих експлантів, %	Інфікованих, %		Ефективність деконтамінації, %	Період регенерації, дб
			на 10 добу	на 30 добу		
Пазушна брунька	50	36	32	35	1	57
Квітка	100	47	19	33	5	93
“Основа суцвіття”	50	53	17	21	15	72



У різних варіантів відмічені особливості морфогенезу. Зокрема, під час культивування ізольованих експлантів листки оцвітини квітки з вкороченою оцвітиною і основа суцвіття збільшувались у розмірах та набували зеленого забарвлення (рис. 3.5). В їх основі закладались бруньки як квіткові так і вегетативні. Також розросталось й квітколоже (рис. 3.6).



Рисунок 3.5 – Розростання оцвітини квітки *Agapanthus umbellatus*

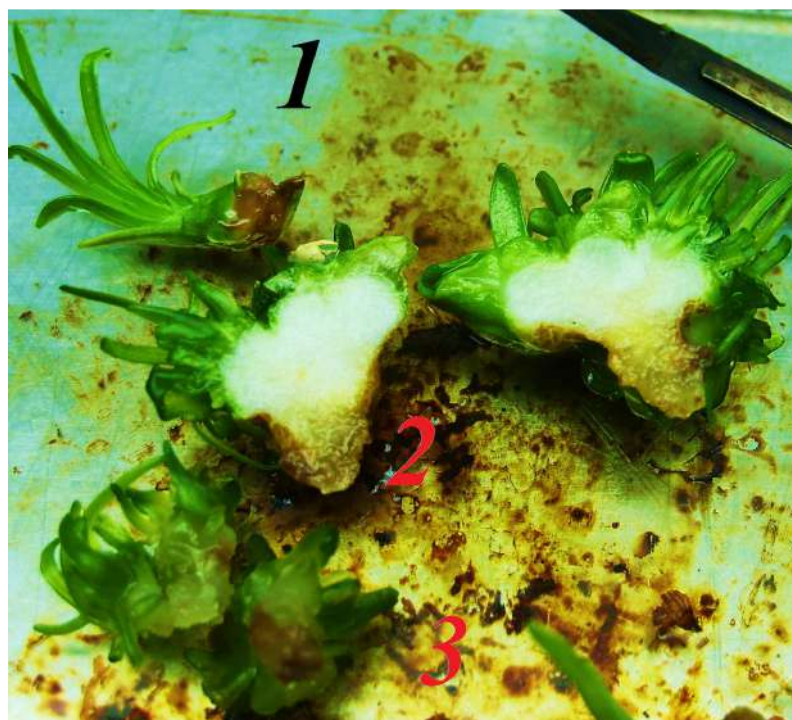


Рисунок 3.6 – Початок утворення первинних регенерантів *Agapanthus umbellatus* із експлантів на 45 добу культивування: 1 регенеранти з основи суцвіття; 2 регенеранти з квітки; 3 вітрифіковані регенеранти з квітки

Однак, формування пагонів з таких бруньок відбувалось повільніше, порівняно з бруньками, які утворилися в основі суцвіття. Частина експлантів набувала ознак вітрифікації.

Водночас, з основи суцвіття утворювався один, рідше два регенеранти, тоді як на експлантах квіткового походження формувалось 5-9 регенерантів (рис. 3.7), а в деяких випадках до 20 шт. У першому випадку рослини були більших розмірів та утворювали дочірні рослини, а в другому – регенеровані рослини були меншими та щільно розміщеними одна біля одної.

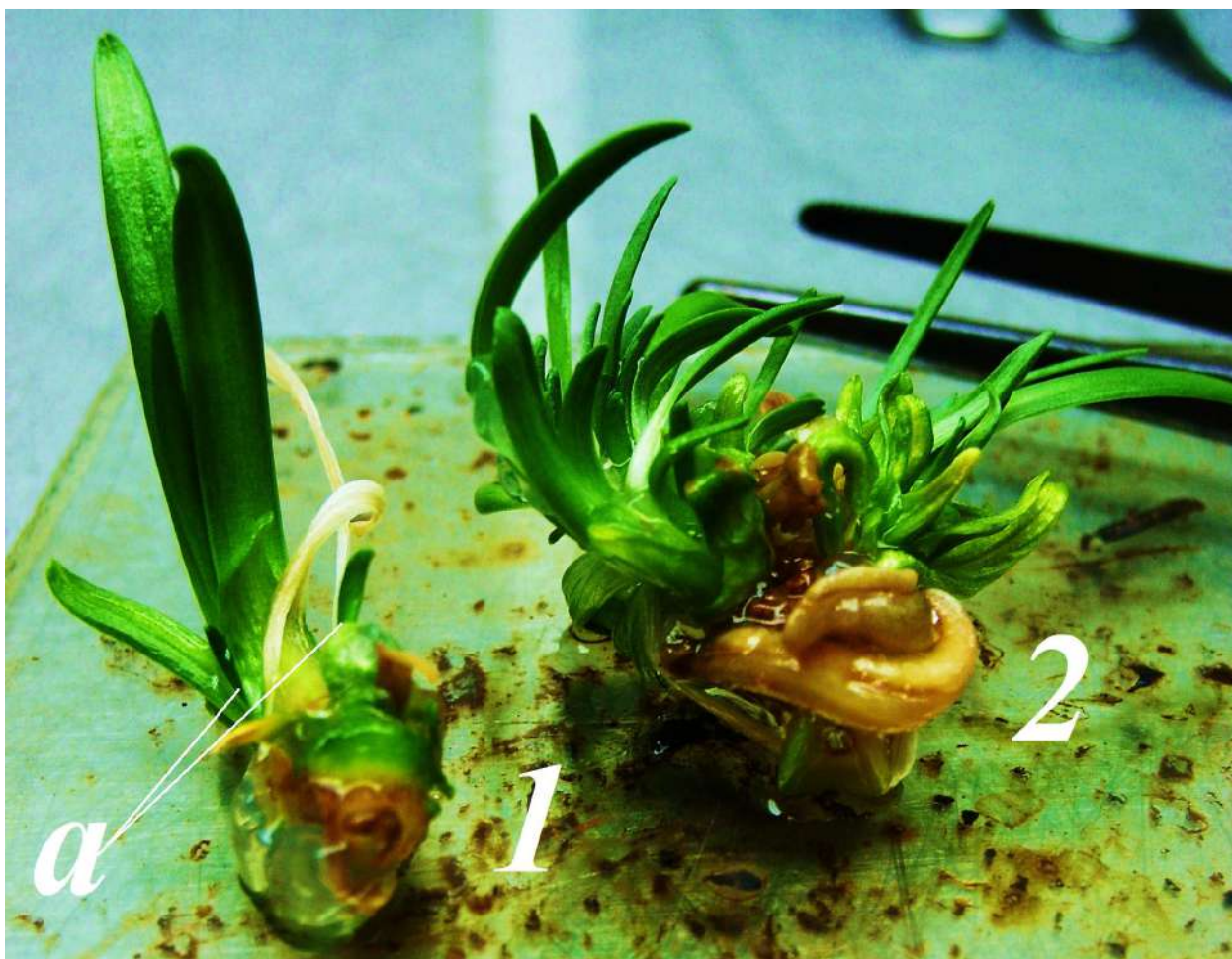


Рисунок 3.7 – Утворення первинних регенерантів *Agapanthus umbellatus* із експлантів на 90 добу культивування: 1 регенеранти із основи суцвіття; 2 регенеранти із квітки; а – утворення дочірних рослин

Таким чином, встановили наступні параметри які визначали ефективність утворення регенерантів за введення в асептичні умови експлантів:



1. Оптимальний період для введення експлантів *in vitro* – це відновлення в їх донорів вегетації.
2. У разі потреби відновити вегетацію у донорів експлантів можна обробкою рослин розчином гібереліну.
3. Якщо складно ввести як експланти бруньки, меристеми доцільно застосовувати ділянки із меристемою активністю.
4. Вид експланта впливає на морфогенез та період необхідний на утворення рослини-регенеранта.

### 3.2. Деконтамінація

#### ***Наявність контамінуючої мікрофлори в повітрі лабораторії.***

Основними джерелами контамінування експлантів *ex vivo* є ендо- і екзогенна мікрофлора, яка міститься в рослинному матеріалі та мікрофлора, яка містище знаходиться в повітрі, зокрема в приміщенні, де відбуваються роботи з ізоляції і введення в асептичні умови. Для аналізу наявності найбільш поширених контамінантів лабораторного повітря нами було поставлено в працюючій ламінарній шафі та на відстані 1 м від неї відкриті банки ємністю 370 мл з попередньо простерилізованим живильним середовищем MS на одну годину (рис. 3.8).

До тестування повітря в ламінарній кімнаті за дві доби проводилось вологе прибирання з додаванням в миючий розчин 3% гіпохлориту натрію (комерційний препарат «Білизна Мілам») та обробка впродовж 8 годин бактерицидними опромінювачами.

Незважаючи на проведені заходи, за результатами візуального аналізу та огляду банок із середовищем під світловим мікроскопом зі збільшенням у 40 раз встановили, що більшість контамінантів становили бактерії роду *Pseudomonas* та гриби *Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis*.

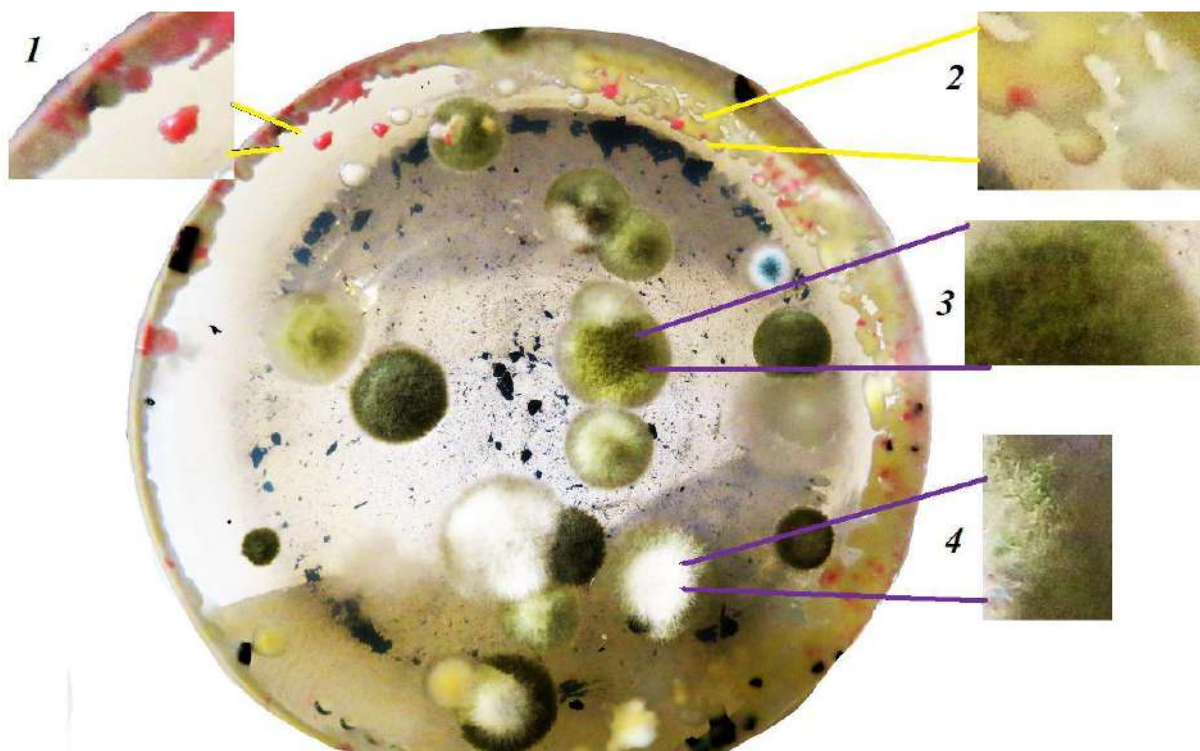


Рисунок 3.8 – Контаміноване штучне живильне середовище: 1, 2 бактеріальне (*Pseudomonas* та ін.); 3, 4 грибне (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis* та інші).

Отже, лабораторне повітря за межами ламінарної шафи містило контамінуючі мікроорганізми.

**Застосування для деконтамінації гіпохлориту натрію.** Отримати стерильні експланти можна лише застосовуючи методи звільнення від ендотаксогенних мікроорганізмів-контамінантів, які можуть забруднювати рослинні об'єкти та живильне середовище. Найчастіше це хімічна деконтамінація сполуками ртуті, срібла або гіпохлорити натрію чи кальцію. Серед них гіпохлорити менш шкідливі для працюючих та оточуючого середовища, мають меншу вартість та більш поширені. Існують комерційні препарати, що застосовуються в побуті як відбілювачі та антисептики.

У випадку зменшення впливу стерилізуючого агенту збільшується відсоток інфікування, що потребує повторних стерилізацій, а в разі інфікуванням сапрофітними мікроорганізмами – до загибелі експлантів (рис. 3.9). Тому, нами випробувано різні схеми застосування в комплексі з гіпохлоритом (комерційний препарат “Білизна”) двох і більше стерилізуючих

агентів: нітрат срібла, фундазол (д.р. беноміл), етанол, перманганат калію на експланти хости сорту Паульс Глорі (Paul's Glory) [143].

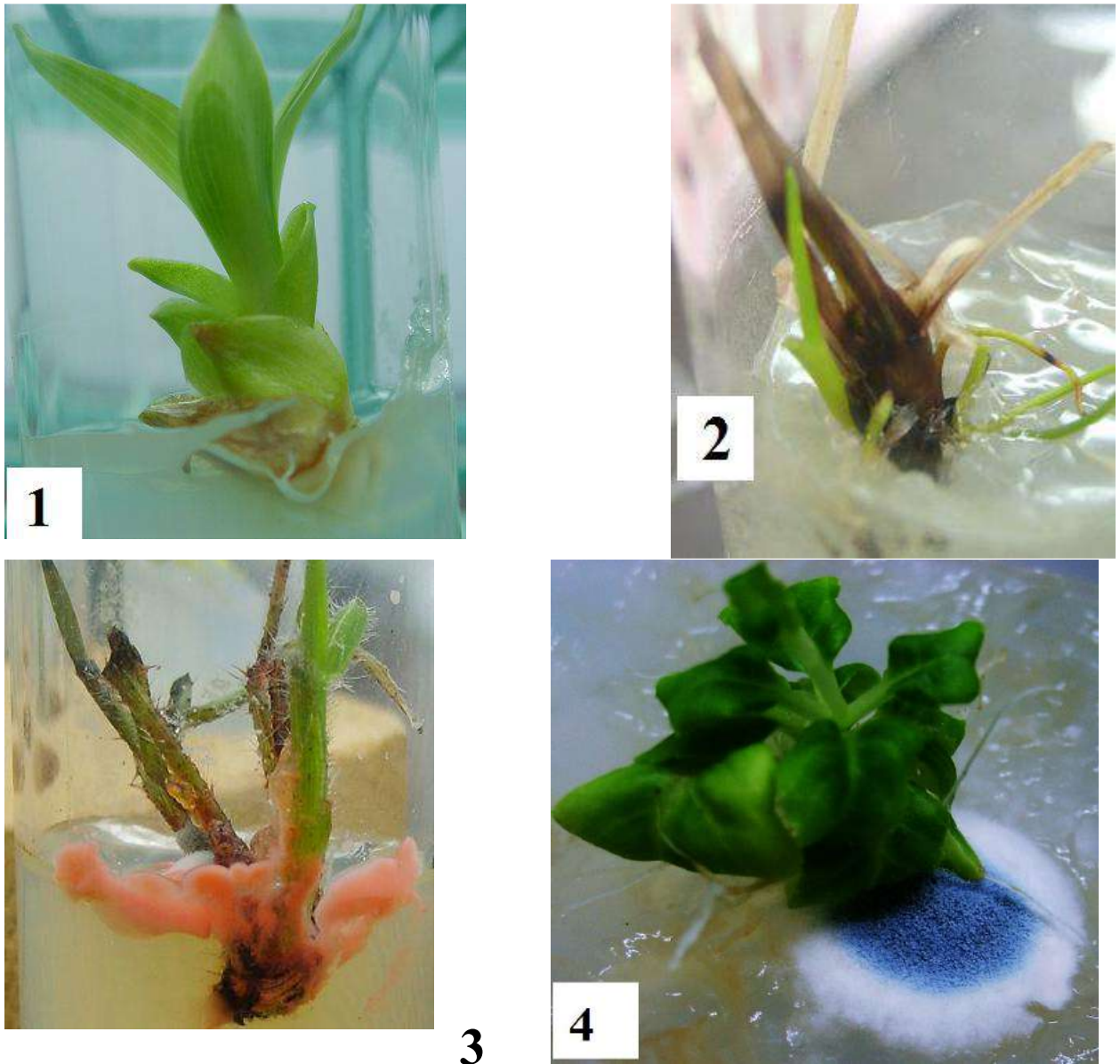


Рисунок 3.9 – Різні прояви дії деконтамінатів, де : 1 – експлант хости візуально вільний від котамінантів; 2 - морфогенез *Miscanthus (sinensis) giganteus* з адвентивних бруньок які не контактували із антисептиком, а покривні тканини пошкоджені; 3 - контамінування регенерантів *Miscanthus* бактеріями *Pseudomonas*; 4 - контамінування цвілевими грибами середовища внаслідок неякісної стерилізації експлантів *Hydrangea macrophylla*. 1 та 2 експланти стерильні а 3 і 4 контаміновані (недостатня дія деконтамінатів).

Регенеранти культивували *in vitro* на штучному живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга з додаванням 30 г/л сахарози. Обсяг вибірки становив 30 рослин. Експозиція обробки стерелізуючими

розчинами становила 20 хв. Фундазол, перманганат калію додавали в стерилізуючий розчин з автоклавованою водою та гіпохлоритом натрію розведеним з автоклавованою дистильованою водою 1 до 2. Етанол, використовували перед обробкою гіпохлоритом натрію (дві й двадцять хвилин, відповідно). Нітрат срібла (5 мг/л) додавали в живильне середовище.

Встановили, що відсоток приживання та контамінування експлантів залежав від сумісного застосування гіпохлориту натрію з іншими стерилізуючими агентами (рис. 3.10). Оскільки стерилізуючі речовини діють токсично як на контаміанти, так і тканини експлантів [98], тому виживала лише частина експлантів.

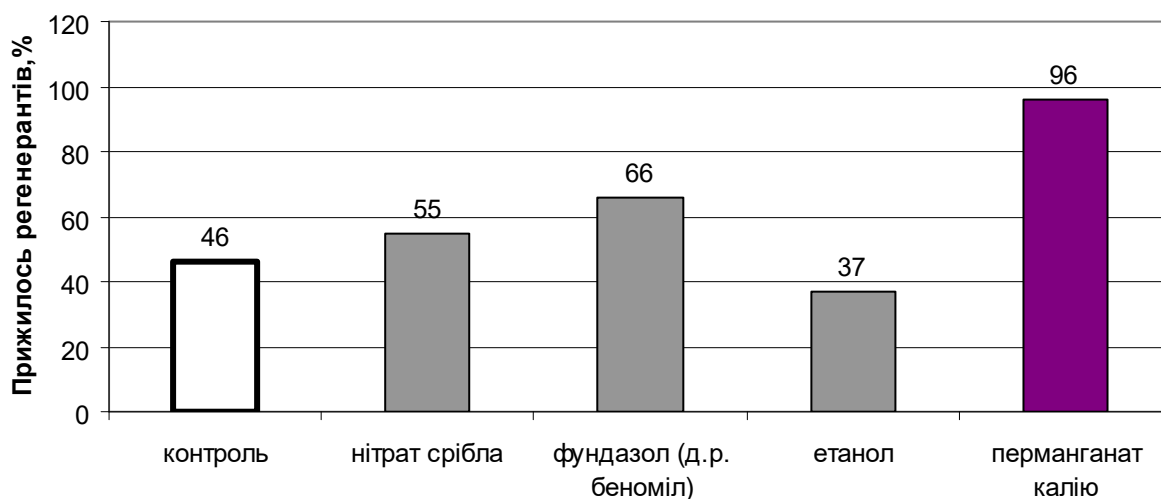


Рисунок 3.10 – Вплив використання стерелізуючих агентів у комплексі з гіпохлоритом натрію на приживання (%) експлантів хости, сорту Пульс Глорі

Найменше вижило експлантів у випадку із застосуванням етанолу (37%) та в контролі (46%). Стерилізація з використанням гіпохлориту натрію й нітрату срібла або фундазолу збільшувала відсоток виживання експлантів. Припускаємо, що причиною цього могло бути зменшення фітотоксичності хлору у згаданих речовинах. Зокрема, за додавання фундазолу з стерелізуючого розчину виділявся в повітря хлор (про це свідчив запах вільного хлору).

Найменша фітотоксичність гіпохлориту відмічена за додавання перманганату калію в кількості 0,05 мг/л. Застосування цієї суміші дозволило зберегти живими 96 % експлантів. У подальшому, навіть, збільшення експозиції вдвічі та концентрації гіпохлориту (суміш “білизни” й води доводили як 1 до 1) за сумісного застосування зберігало невисоку фітотоксичність (7% загиблих експлантів). Подібна, але з іншими концентраціями суміш відома як препарат “Хлорокс” [72, 106].

Серед експлантів, які вижили, рівень контамінування залежав від компонентів стерилізуючого розчину (рис. 3.11). У випадку застосування одного гіпохлориту натрію (контроль) контамінованими було 67% експлантів. У варіанті експланти мали опіки покривних тканин, місць зрізу та вповільнений морфогенез. Додавання до гіпохлориту натрію перманганату калію знижувало лише на 4 відсотки контамінування, але експланти не мали опіків і регенерували рослини. Інфіковані експланти за такої стерилізації успішно витримували по дві-три повторні стерилізації.

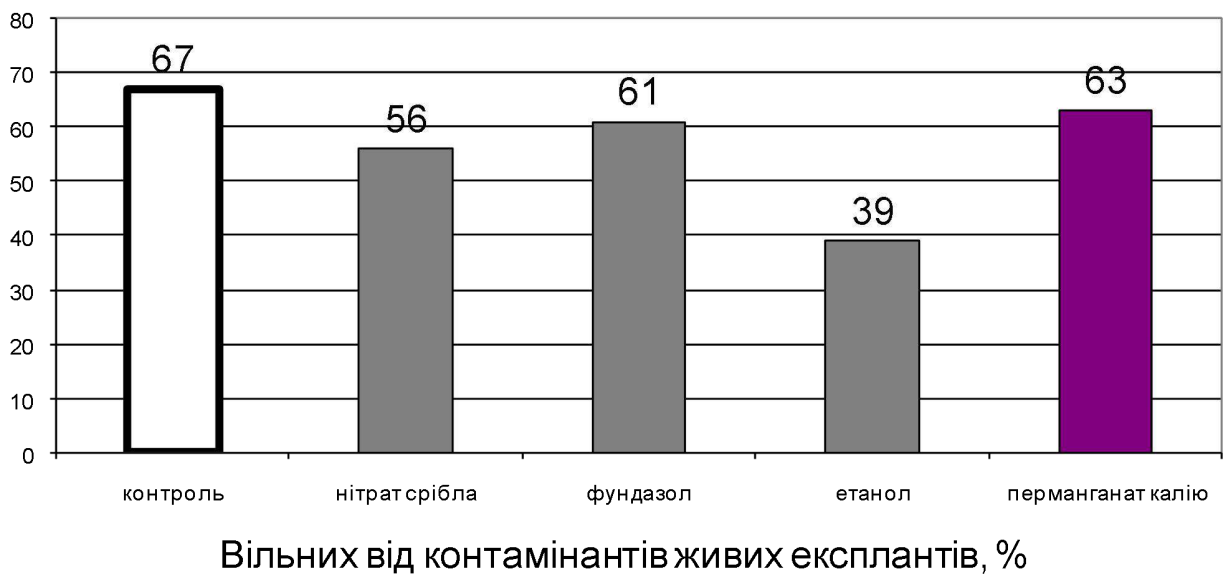


Рисунок 3.11 – Вплив використання стерелізуючих агентів в комплексі з гіпохлоритом натрію на звільнення експлантів хости сорту Пульс Глорі від контамінантів, %

Через порівняно швидке розкладання гіпохлориту натрію складно визначити кількість речовини, необхідної для приготування стерилізуючого розчину. За порівняння ефективності стерилізації залежно від умов зберігання маточних розчинів встановили збільшення відсотку контамінованих експлантів після короткого строку – 15 діб з моменту розфасування препарату (табл. 3.5). При зберіганні розчинів на світлі 60 діб втрачався стерелізуючий ефект. Лише 6 % експлантів були вільними від інфекції, а за зберігання розчинів в темряві їх було – 28 %.

Таблиця 3.5 – Ефективність стерилізації експлантів хости розчином гіпохлориту натрію залежно від умов зберігання, %

Діб з моменту розфасування препарату		15	30	45	60	НІР <sub>05</sub>
Умови зберігання гіпохлориту натрію	на розсіяному світлі	35	26	13	<b>6</b>	6
	в темряві	37	43	31	32	4
НІР <sub>05</sub>		5	4	5	6	

Втрата стерилізуючого ефекту супроводжувалась зміною розчином кольору: з типового “марганцівкового” на синій, а потім “буро-зелений”. Чим “старіший” розчин, тим швидше відбувалася зміна кольору (додаток А). Звичайно швидше змінювався колір розчину приготовленого з маточних розчинів, які зберігалися на світлі. Таким чином, швидка зміна кольору розчину може бути індикатором втратою гіпохлориту натрію стерелізуючого ефекту.

Наприклад, у рослин картоплі *in vitro* було ідентифіковано *B. pumilus*. Забруднення культури тканин цим видом бактерій стало більш помітним під час використання прозорих агентів, на яких мікробні забруднення помітніші, ніж на напівпрозорих агарових середовищах, де присутність бактерій



маскується. Нами в якості прозорого гелеутворювача успішно використано гелан гумі: геланова камедь – Е 418 [138]. Повністю звільнитися від ендofітного забруднення вдалося лише в результаті застосування антибіотиків [279].

За способом додавання в середовище термостійких антибіотиків можна розділити на дві групи: перша ті, які є термолабільними і їх можна, застосовуючи мікрофільтри, додавати в проавтоклавоване і охолоджене до 45-55 °С середовище. Це більшість антибіотиків, що застосовуються для контамінації експлантів. Наприклад, стрептоміцин, цефотаксин та інші. Цефотаксин в 400 мг/л успішно застосовувався для додаткової стерилізації горіха (*Juglans regia* L.) після поверхневої деконтамінації експлантів гіпохлоритом натрію [222]. За використання антибіотику цефотаксиму вдалося отримати експланти горіха грецького (*Juglans regia* L.). Враховуючи те, що ця речовина розкладається під час автоклавовання її додають в готове й охолоджене середовище, застосовуючи бактеріальні фільтри. Також цей антибіотик можна використовувати до введення в асептичні умови, наприклад із експлантами горіху. Їх за тиждень перед введенням в культуру *in vitro* обробляли водним розчином (200 мг/л) антибіотику «Цефотаксим».

До другої групи відносять порівняно термостабільні антибіотики тобто, такі, що витримують високі температури під час автоклавовання. Їх додають до середовища перед автоклавованням. Це зокрема, левоміцетин (хлорамфенікол), гентаміцину сульфат. Так, левоміцетин входить до складу агару, що використовується для приготування селективних середовищ, які знищують бактерії. Відомим є застосування бенгальського рожевого агару (DRBC) з дихлораном та хлорамфеніколом. Дихлоран та рожевий бенгальський перешкоджають росту плісняви (виконують роль фунгіцидів), а левоміцетин інгібує ріст бактерій [75]. Левоміцетин ефективний у кількості 100 мг/л для деконтамінації експлантів ірису від ендofітних бактерій родів *Ervinia* та *Pseudomonas* [223].

Запропонована нами стерилізуючи суміш для хости не звільнює від глибокого контамінування ендofітною мікрофлорою. Оскільки, більшість експлантів після перших діб асептичного культивування виявились візуально забруднені бактеріальною інфекцією, то в живильне середовище перед автоклавуванням додавали термостабільні антибіотики з бактерицидною дією (левоміцетин, гентаміцину сульфат).

Вид антибіотика, сорт рослини і період культивування експлантів, що залишилися контамінованими після стерилізації гіпохлоритом натрію та перманганатом калію і були в подальшому висаджені на середовище з антибіотиками, впливали як на виживання експлантів, так і на звільнення від інфекції (табл. 3.6). Додавання левоміцетину у середовище і вирощування контамінованих експлантів сорту Патріот на ньому впродовж 15 діб зменшувало кількість контамінованих рослин з 100 до 49 % та в результаті культивування 60 діб – 36 %.

Подібне відмічено в сорту Гіацінтіна. На середовищі з сульфатом гентаміцину на 15 добу культивування, порівняно із середовищем, що містило левоміцетин, виявилось більше контамінованих експлантів на 4-6 %. Окрім цього, середовище набувало рідшої консистенції, внаслідок чого експланти занурювалися глибше у розчин, порівняно з середовищем з левоміцетином.

Сумісне застосування половинних концентрацій обох антибіотиків, порівняно із повними, але окремими, збільшувало як загибель експлантів на 15-17%, так і кількість деконтамінованих експлантів. Подовження періоду культивування за використання обох антибіотиків збільшувало відсоток загинуваних експлантів та зменшувало кількість контамінованих. Отже, якщо після стерилізації гіпохлоритом натрію й перманганатом калію залишилось глибинне інфікування контаміновані експланти доцільно пересаджувати на середовище з левоміцетином.



Таблиця 3.6 – Ефективність деконтамінації антибіотиками експлантів хости (*Hosta gybrida*)

Антибіотик	Період вирощування, діб	Сорти								
		Патріот					Гіацінтіана			
		прижи- лось, %	контамі- новано, %	контамі- новано, %	прижи- лось, %	контамі- новано, %	контамі- новано, %			
левоміцетин (хлорамфенікол) 250 мг/л	15	98	49		97	53				
	30	61	44		53	42				
	60	34	36		15	31				
гентаміцину сульфат 160 мг/л	15	97	53		91	59				
	30	94	41		82	47				
	60	89	39		77	45				
левоміцетин (хлорамфенікол) 125 мг/л + гентаміцину сульфат 80 мг/л	15	83	21		79	28				
	30	51	12		61	19				
	60	18	9		15	14				
НІР <sub>05</sub>		4	7		5	6				

**Особливості введення *in vitro* Agapanthus.** Види агапантусу, це цінні декоративні рослини, однак широке розповсюдження її стримується повільним розмноженням. За вегетативного способу коефіцієнт становить близько 1: 5 з повторним діленням через 4-5 років, а за насінневого розмноження рослини зацвітають на 5-7 рік і до того ж не зберігається генетична стабільність садивного матеріалу [1], для швидкого комерційного розмноження цієї культури використовують МКР [289]. Однак, стримуючими

факторами для введення в асептичну культуру нових сортів є глибоке контамінування експлантів грибною та бактеріальною мікрофлорою. Застосування гіпохлориту для поверхневої стерилізації не дало бажаних позитивних результатів. Високі концентрації або тривалі експозиції використання препарату призводили до токсикації рослинних тканин. За зменшення дії стерилізуючого агента збільшувався відсоток інфікованих експлантів, що потребувало повторної обробки і не завжди дозволяло зберегти матеріал [98]. Тому, під час розробки системи стерилізації експлантів агантанусу нами випробувано різні схеми застосування препаратів у комплексі з гіпохлоритом натрію (комерційний препарат “Білизна”) стерилізуючих агентів системної дії (антибіотики та фунгіциди).

На ефективність деконтамінації експлантів *Agapanthus umbellatus* сорту Charlotte впливало місце ізоляції їх з донорської рослини *in vivo* (табл. 3.7). Найнижчим цей показник (1 %), був за використання пазушних бруньок, розміщених на підземному кореневищі. У цьому випадку більшість інфекції проявлялась уже на 10 добу культивування, а на 30 добу вільними від контамінантів залишився лише один експлант із 100 ізольованих. Найвища ефективність деконтамінації була на варіанті “основа суцвіття” – 15 %.

Таблиця 3.7 – Вплив типу експлантів *Agapanthus umbellatus* на їх деконтамінацію, сорт Charlotte

Тип експлантат	Інфікованих, %		Ефективність деконтамінації, %
	на 10 добу	на 30 добу	
Пазушна брунька	32	35	1
Квітка	19	33	5
“Основа суцвіття”	17	21	15

В подальшому нами цей метод удосконалено за результатами випробування ефективності додаткових деконтамінантів, які застосовувались на фоні суміші гіпохлориту натрію та перманганату калію (табл. 3.8).

Таблиця 3.8 – Вплив сумісного застосування із гіпохлоритом натрію антибіотиків та фунгіцидів на деконтамінацію експлантів (основа суцвіття) *Agapanthus* сортів Charlotte, Black magic

Тип експланта	Живих експлантів, %		Ефективність деконтамінації, %		Початок утворення адвентивних бруньок, діб		Утворилося регенерантів, %	
	Charlotte	Black magic	Charlotte	Black magic	Charlotte	Black magic	Charlotte	Black magic
Контроль	52,1	56,7	14,2	17,6	64,6	51,8	3,2	7,1
Левоміцитин - Дарниця (Chloramphenicol)	53,8	51,2	14,9	12,3	72,1	69,6	1,1	3,8
Гентаміцину сульфат - Дарниця	50,6	60,4	10,9	14,4	61,2	58,4	1,7	3,3
Фундазол*	62,1	67,3	15,3	19,6	71,0	67,6	1,9	5,5
Превікур Енерджі**	71,5	73,9	40,2	47,6	27,4	21,4	24,3	28,8
Максим Форте	70,1	68,6	38,3	41,6	61,8	59,7	9,3	7,2
НІР <sub>05</sub>	3,3	4,0	1,6	2,8	-	-	2,6	0,9

\* Беноміл 500г/кг виробник: «Агро-Кемі Кфт.», Угорщина.

\*\* Превікур Енерджі 840 SL, в.р.к. - Bayer Garden \*\*\* 050 FS т.к.с. - Syngenta

Інший вплив антибіотиків: левоміцетину та гентаміцину сульфату, які випробували в процесі введення *in vitro* хости, виявлений за деконтамінації експлантів видів рослин роду агапантус: агапантус африканський (*agapanthus umbellatus* сорт 'Charlotte'), та агапантус ранній (*agapanthus praecox* сорт 'Black magic').

Незважаючи на ефективність застосування антибіотиків для деконтамінації експлантів хости [144] їхня дія не проявилась у випадку з

*Agarantus*. Причиною цього може бути контамінування ескплантів не тільки бактеріями але й грибами. Прикладом може бути наявність грибною інфекції в ендоспермі *Castanea sativa* Mill. [169].

Окрім цього, застосування левоміцетину, порівняно з контролем (без додаткових деконтамінантів лише суміш гіпохлориту натрію та перманганату калію), вповільнювало утворення та зменшувало кількість адвентивних бруньок із 3,2 % до 1,1 % у сорту Charlotte та з 7,1 до 3,8 %, відповідно, у сорту Black magic.

Ефективність застосування як додаткового деконтамінанта фунгіциду Фундазол (беноміл) статистично не відрізнялось від контролю. Варіант із застосуванням Превікур Енерджі 840 SL переважав як контроль, так і решту варіантів за всіма досліджуваними показниками. Зокрема, в сорту Charlotte виживання ескплантів, порівняно з контролем, зросло з 52,1 до 71,5%, а показник деконтамінації зріс із 14,2 до 40,8 %. Зменшився період необхідний для утворення в ескплантів адвентивних вегетативних бруньок, які відокремлювалися в наступних субкультуваннях і утворювали мікророслини.

Також відмічено збільшення виходу регенерантів з ескплантів із 3,2 % в контролі до 24,3%. Максим Форте 050 FS переважав контроль за всіма показниками але поступався Превікур Енерджі 840 SL. Отже, зростання відсотку живих ескплантів після стерилізації Превікур Енерджі 840 SL та скорочення періоду необхідного для утворення адвентивних бруньок і збільшення виходу регенерантів свідчить не лише про деконтамінуючий вплив препарату на ескпланти (фунгіцидна дія), але і стимулюючий ефект від його застосування на регенераційний процес.

***Вплив походження й виду ескпланта на ефективність деконтамінації.*** Ефективність введення ескплантів у асептичні умови залежить від умов вирощування рослин, з яких їх ізольовували. Встановлено вплив походження рослин донорів *Agarantus umbellatus* на звільнення ескплантів від контамінантів (табл. 3.9). Від рослин сорту Charlotte, які

тривалий час в нативних умовах росли, квітували та розмножувались вегетативно, отримано експланти з нижчим рівнем деконтамінації, ніж рослин, які виростили із насіння і вперше утворили бутони. Це дозволило припустити, що тривале вегетативне розмноження в звичайних умовах підвищує контамінацію мікроорганізмами посадкового матеріалу.

Таблиця 3.9 – Вплив походження рослин донорів *Agapanthus umbellatus* на деконтамінацію експлантів, (сорт Charlotte)

Рослини донори	Живих експлантів, %	Інфікованих, %		Ефективність деконтамінації, %
		на 10 добу	на 30 добу	
пройшли два і більше поділи <i>in vivo</i>	72±4	10±2	21±3	41
без поділу, перше цвітіння	77±5	2±1	3±1	72

Деконтамінація експлантів залежить від їх особливостей. Нами встановлено вплив виду експлантів на успішність деконтамінації та перших асептичних культивувань на наступних видах рослин: туя західна, хоста, кактус, агапантус. Зокрема, для оптимізації технології МКР туї західної за ефективністю деконтамінації порівнювали такі види експлантів ізольованих в нативних умовах: верхівкові меристеми пагона (0,2-0,3 мм), живці, отримані з однорічного приросту пагона, насіння, пагін проростка з двома хвоїнками, отримані з насіння на перлітному субстраті (табл. 3.10).

За першого асептичного культивування встановили, що вид експланта впливав на контамінацію регенерантів. Найбільша кількість інфікованих об'єктів встановлена за введення *in vitro* стеблових живців. Це може бути результатом глибокого проникнення контамінуючих агентів у тканини експлантів. Використання насіння, як експлантів, зменшувало, порівняно з живцями, контамінацію з 82,3 до 67,8%. Серед експлантів досліджуваних

видів найбільша кількість асептичних отримана за використання пагонів проростків.

Таблиця 3.10 – Вплив виду експланта на ефективність введення *Thuja occidentalis* 'Smaragd' в асептичні умови

Тип експланта	Контаміновано, %	± до контролю
Меристема (контроль)	9,3	-
Стебловий живець	82,3	+73,0
Насіння	67,8	+58,5
Нагін проростка	7,2	- 2,1
НІР <sub>05</sub>	3,1	-

У представників родини кактусових (*Astrophytum* та *Sclerocactus*) на морфогенез та контамінацію експлантів також впливали біологічні особливості (табл. 3.11). Високий відсоток контамінування *Astrophytum myriostigma* v. *monstrosa* cv. "Lotus Land", на нашу думку, пов'язаний із значною опушеністю об'єкта. Експлантам рослин цього виду властивий більший, порівняно із *Sclerocactus*, відсоток загиблих та менша кількість морфогенних експлантів.

Відомо, що брунькові луски деяких видів рослин містять значну кількість гормону спокою – АБК. Видалення криючих лусок та додавання регуляторів росу у живильне середовище позитивно впливало на регенерацію первинних експлантів хурми [68]. Це було неодноразово підтверджено і в нашій роботі, зокрема під час введення в асептичну культуру павловнії та підщепи GF-677 (табл. 3.11). Окрім негативного впливу на морфогенез *in vitro* та ефективність деконтамінації встановлено більшу кількість первинних регенерантів із фенолоподібним ексудатом у варіанті, де зберігались криючі луски (контроль) (табл. 3.12).

В експлантів хости ефективність стерилізації також значною мірою залежала від їх походження. Наприклад, за використання експлантами

пазушних бруньок ряд дослідників мали проблеми з грибним та бактеріальним контамінуванням пазушних підземних бруньок [320, 323].

Таблиця 3.11 – Вплив виду кактусів на контамінування та морфогенну активність первинних експлантів (фотоперіод 12 годин)

Вид	Живих експлантів, %			Загинуло експлантів, %
	контаміновано	калюсогененні	морфогенні	
<i>Astrophytum myriostigma</i> v. <i>monstrosa</i> cv. "Lotus Land"	47	8	16	29
<i>Sclerocactus spinosior</i> ssp. <i>Blainei</i> "schleseri"	5	13	78	4
НІР <sub>05</sub>	4	2	3	2

Таблиця 3.12 – Вплив на деконтамінацію та приживання первинних експлантів видалення криючих лусок павловнії та підщепи GF-677, %

Варіант	Контамінованих	Із фенольним ексудатом	Морфогенних
Павловнія			
Контроль*	94±3	77±6	4±2
З видаленням	22±5	6±2	67±5
GF-677			
Контроль*	82±3	73±9	6±2
З видаленням	61±4	28±4	18±4

\*без видалення криючих лусок

Нами (табл. 3.13), за порівняння ефективності використання таких бруньок і бутонів встановлено наступне: у чотирьох сортів за кількістю стерильних експлантів переважали ізольовані з бутонів. Однак, у сортів Гіацінтіана та Агалон виявлені соматкони, які відрізнялись за забарвленням

листіків (рис. 3.12): один з 11 експлантів та три з 13 відповідно відрізнялися за забарвленням.

Таблиця 3.13 – Кількість стерильних експлантів та соматоклонів залежно від сорту та типу експлантата хости

Сорт	Патріот		Гіацинтіна		Халціон		Агалон	
	брунька	буто́н	брунька	буто́н	брунька	буто́н	брунька	буто́н
Виділено експлантів, шт.	86	24	57	18	51	23	93	16
Контаміновано, шт.	53	21	33	11	36	19	59	13
Соматоклонів, шт.	-	-	-	1	-	-	-	3

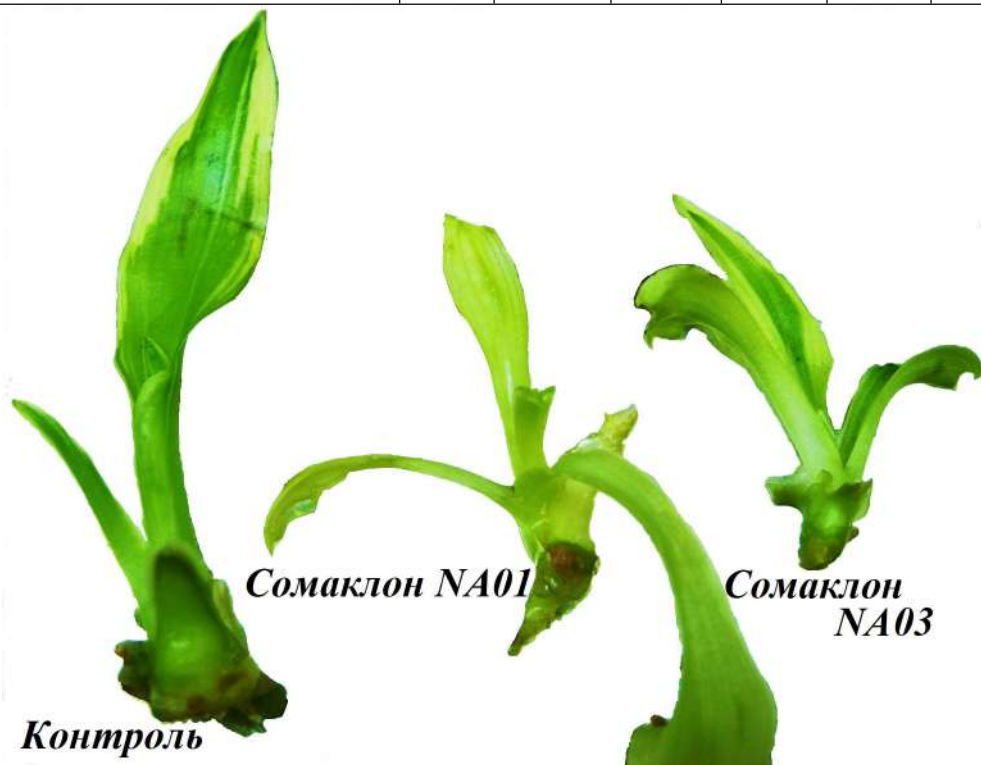


Рисунок 3.12 – Зміна забарвлення листків в соматоклонів хости сорту Агалон

*Порівняння ефективності застосування різних деконтамінантів в процесі деконтамінації та виживання первинних експлантів персика. Для захисту від забруднюючої рослинний матеріал мікрофлори порівнювали*



ефективність використання таких антисептиків: гіпохлорит натрію (контроль); Бланідас 300; АСД Ф-1.

Зіставляючи вище вказані речовини з антисептичними властивостями як деконтамінантів встановили неоднакову кількість експлантів, що виживали після обробки вказаними речовинами (рис. 3.13).

Обидва дослідні варіанти за кількістю експлантів, які не були ушкоджені і вижили, переважали контроль. Так, застосування гіпохлориту натрію в контролі призвело до опіків з подальшим утворенням некрозів. У цьому варіанті вижила третина висаджених експлантів (в середньому за трьома повтореннями 33,7 %).



Рисунок 3.13 – Вплив деконтамінантів на кількість живих експлантів після обробки,% (персик, сорт Щедрий).

Серед живих експлантів між варіантами виявлена суттєва різниця за ефективністю звільнення від контамінуючої мікрофлори (рис. 3.14). Як кращий виділився варіант з використанням препарату Бланідас 300 (0,7 г на 100 мл дистильованої води).

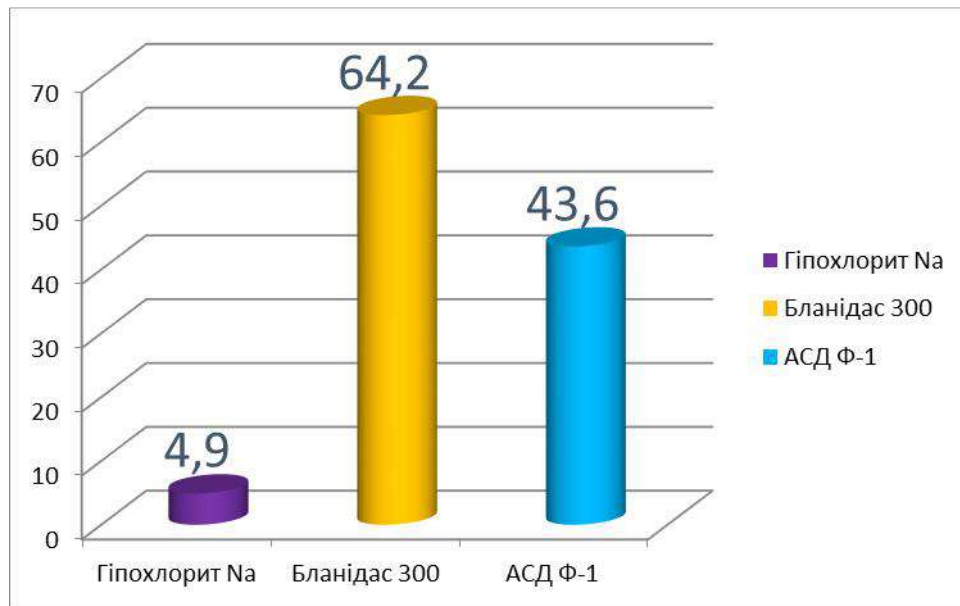


Рисунок 3.14 – Вплив деконтамінантів на вихід експлантів вільних від контамінуючої мікрофлори, персик, сорт Щедрий (у відсотках до висаджених) .

Не всі живі експланти були вільними від мікроорганізмів. Поява останніх призводила, найчастіше, до одного або декількох з таких наслідків:

- анаеробне бактеріальне забруднення середовища, що проявлялось у вигляді появи ділянок сіро-білого матового забарвлення;
- поверхнєве заростання середовища аеробними мікроорганізмами (в першу чергу грибами родів Мукор, Пеніцил, Аспергіл);
- мацерація тканин експлантів мікроорганізмами.

Отже, застосування для деконтамінації розчину Бланідас 300 забезпечує отримання 96,1 % живих та 64,2 % вільних від мікроорганізмів експлантів персику сорту Щедрий.

**Застосування біоциду РРМ як додаткового деконтамінанта.** Обробка експлантів гіпохлоритом натрію дозволяє знищити контактним шляхом екзогенні контамінанти. Застосування антибіотиків і фунгіцидів для боротьби з ендогенними мікроорганізмами в недостатній мірі технологічне, з вузьким спектром дії згаданих препаратів, а тому пошук нових речовин і підходів в

деконтамінації триває. Наприклад, закордонні дослідники успішно застосовують біоцид РРМ [266].

За нашими дослідженнями на ефективність застосування цього препарату впливало положення експлантів в культуральній ємності (рис. 3.15). Як експланти використовували бруньки у фазі «зелений конус». Якщо вони були не повністю занурені в середовище, то частина їх або поверхня середовища інфікувалась. Лише за повного занурення рослинного матеріалу можна досягнути деконтамінації. З часом із експлантів відростають регенеранти без ознак контамінування.

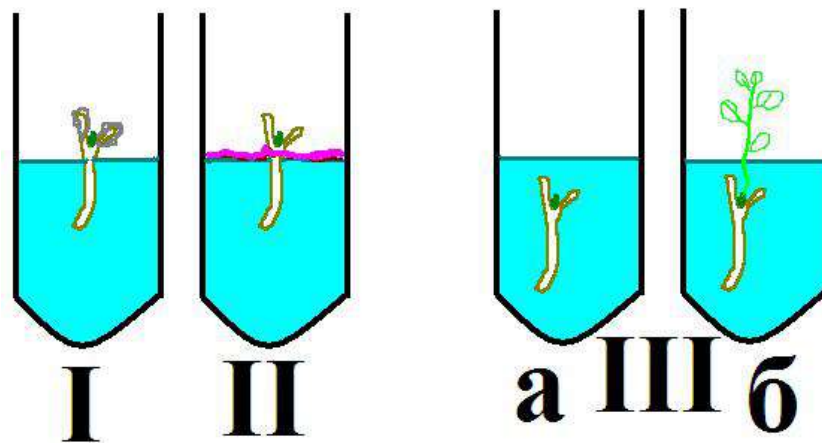


Рисунок 3.15 – Вплив положення експланта на ефективність РРМ доданого в живильне середовище, де: I – заростання експлантат мікроорганізмами; II – заростання поверхні середовища мікроорганізмами; III – асептичний експлант за повного занурення в живильне середовище: а – в момент посадки; б – через 15-25 діб культивування.

Досліджено також вплив тривалості культивування експлантів на живильному середовищі із 2 мл/л РРМ (табл. 3.14) на ефективність деконтамінації. У кожному варіанті висаджували по 100 експлантів ожини сорту Рубен та фундука сорту Барселонський. За коротких періодів культивування в 5 і 10 діб відмічено значні відсотки рецидивів за подальшої пересадки на середовище без РРМ. Зокрема за п'ятиденного культивування рецидиви становили 81 % в ожини та 89 % в фундука за кількості живих

експлантів в 97 і 92 %, відповідно. Під час довгого періоду культивування на середовищі з біоцидом збільшувалась кількість стерильних експлантів, однак зменшувалась кількість живих. Візуально токсичний вплив довгого періоду культивування на середовищі з РРМ був наступним: поява фенолоподібних виділень навколо поверхні експланта; відмирання точок росту; в'янення поверхневих покривів; хлорози, які з часом переходили в некрози. Таким чином, для ожина (сорт Рубен) та фундука (сорт Барселонський) оптимальними є періоди первинного культивування в 20 і 25 діб.

Таблиця 3.14 – Вплив тривалості культивування експлантів на живильному середовищі із 2 мл/л РРМ

Тривалість культивування, діб	Живих, шт.		З рецидивами інфекції за пересадки на середовище без РРМ, шт.	
	ожина	фундук	ожина	фундук
5	97	92	81	89
10	96	92	23	57
15	91	90	4	15
20	91	83	0	3
25	68	51	0	1
30	63	48	0	0

Окрім періоду культивування експлантів з повним зануренням в середовище з РРМ нами досліджено вплив концентрацій цієї речовини на ефективність деконтамінації рослинних об'єктів, що належать до різних ботанічних видів та життєвих форм (табл. 3.15). Встановлено низьку ефективність концентрацій в 0,5 і 1,0 мл/л. За першої з них в чагарникових (троянда, ожина) та деревних (вишня, фундук) не було стерильних експлантів та виявлено лише 2 і 3 % за концентрації в 1,0 мл/л, відповідно. Серед травянистих, зокрема, в міскантусу гігантського це становило 1%, а в цмину

італійського – 13 % за концентрації 0,5 мл/л і 8% та 19%, відповідно, за концентрації 1,0 мл/л.

У варіантах з малими концентраціями гинули експланти через ураження мікроорганізмами, що проявлялось у виді некротизації та мацерації тканин.

Таблиця 3.15 – Вплив концентрації РРМ на ефективність деконтамінації експлантів різних видів рослин на 20 добу культивування, %

Життєва форма	Вид рослини	Стан експланта	Концентрація РРМ в середовищі, мл/л						НІР <sub>05</sub>
			0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	
Трав'янисті	Цмин італійський	стерильних	13	19	74	94	100	100	6
		живих	13	18	71	90	63	18	5
	Міскантус гігантський	стерильних	1	8	65	88	97	100	7
		живих	1	7	61	80	65	19	4
Чагарникові	Троянда, сорт Авеланж	стерильних	-	3	29	36	93	100	4
		живих	-	3	29	36	91	62	4
	Ожина, сорт Рубен	стерильних	-	2	23	27	84	94	7
		живих	-	1	23	26	81	57	6
деревні	Вишня, сорт Облачинська	стерильних	-	2	8	39	96	100	5
		живих	-	2	7	36	90	64	4
	Фундук, сорт Барселонський	стерильних	-	-	1	24	87	92	8
		живих	-	-	1	20	68	52	6

Із збільшенням концентрацій РРМ деконтамінаційна здатність підвищувалась, але серед стерильних експлантів зменшувалася кількість живих. Для двох видів трав'янистих рослин оптимальною була концентрація 2,0 мл/л. У цьому варіанті середовища в цмину італійського було до загальної

кількості висаджених 94% стерильних експлантів і 90 % живих. У випадку збільшення концентрації до 2,5 мл/л показник «стерильність» становив 100% але живих було лише 63 %. Подальше зростання концентрації препарату до 3,0 мл/л призвело до спричинило зменшення живих експлантів до 18%. Подібна залежність встановлена і для міскатусу гігантського.

Якщо для трав'янистих концентрація РРМ 2,0 мл/л була оптимальною то для чагарникових і деревних рослин в дослідях вона була малоефективною. Кількість деконтамінованих експлантів становила від 24 % (фундук) до 36 % (троянда). Оптимальною для вказаних життєвих форм виявилась концентрація в 2,5 мл/л. Вихід стерильних експлантів становив при цьому від 86 % (вишня), 87 % (фундук) до 93 % (троянда). Кількість живих, відповідно, була від 68 % (фундук) до 84 % (ожина).

Слід вказати також і на вплив біологічних особливостей видів рослин на ефективність деконтамінації: серед досліджуваних об'єктів найвища ефективність її виявлена в експлантів цмину італійського, а найнижча – в фундука.

Також проведено порівняння ефективності застосування РРМ поряд із антибіотиками та фунгіцидами (табл. 3.16) при введенні в асептичні умови двох видів біоенергетичної верби: *Salix viminalis* (верба прутовидна, природна форма), *Salix triandra x viminalis* (сорт Інгер). Візуально основу контамінантів становили бактерії. Проте додавання ефективного на інших культурах деконтамінанта антибіотика хлорамфеніколу [144] вивилося так само як і фунгіциду Превікуру малоефективним (табл. 3.16). На результативність деконтамінації впливав вид рослин. У всіх варіантах деконтамінатів нижча ефективність стерилізації виявлена в сорту “Інгер”. Контроль та всі інші варіанти, за винятком застосування РРМ були, на нашу думку, технологічно не прийнятними.

У цілому, препарат РРМ в усіх культур, які залучались у наші дослідження засвідчив високу ефективність і технологічну придатність для швидкого введення нових об'єктів в асептичні умови. Цей біоцид є досить

дорогим для умов України: \$ 370,07 за 250 мл без урахування 44% митних зборів (станом на грудень 2013 року), проте, якщо рахувати затрати, які в разі зростають у випадку низької ефективності інших деконтамінантів та оплати праці, електроенергію і т.п., а також витрати технологічного часу на повторне обеззараження цей біоцид доцільно застосовувати як додатковий деконтамінант для зменшення загального інфекційного фону шляхом обробки гіпохлоритом натрію.

Таблиці 3.16 – Ефективність застосування додаткових деконтамінантів за стерилізації експлантів верби

Вид додаткового деконтамінанта	Спосіб застосування	Ефективність стерилізації, %	
		Інгер	прутовидна
Контроль	Обробка експлантів гіпохлоритом натрію	6±1	19±3
Хлорамфенікол	Додавання в живильне середовище	8±2	22±2
Превікур Енерджі 840 SL	Замочування експлантів в 1% розчині	7±2	20±4
PPM	Додавання в живильне середовище	90±5	96±4

**Введення в асептичні умови експлантів кизилу.** В якості деконтамінантів використано наступні речовини: гіпохлорит натрію (контроль); сулема; біоцид PPM; препарат Бланідас 300. Первинними експлантами були ізольовані бруньки з донорних рослин у фазі «зеленого конусу».

На вихід стерильних та живих експлантів впливали як різні деконтамінанти так і біологічні особливості сорту кизилу. Серед досліджуваних варіантів деконтамінантів найменше живих та стерильних експлантів отримано за обробки первинних експлантів сулемою. По сорту

Нижний прижилося 4% і лише 2% були вільними від мікроорганізмів, а по сорту Екзотичний 2% живих, але жодного експланта деконтамінованого.

Таблиця 3.17 – Вплив деконтамінантів на вихід стерильних первинних експлантів (середнє з трьох повторень)

Деконтамінант	Висаджено експлантів, шт		Живих експлантів, шт.		Стерильних експлантів, шт.	
	Н*	Е**	Н*	Е**	Н*	Е**
гіпохлорит натрію	100	100	8	4	3	1
Сулема	50	50	2	2	1	0
РРМ додавання в середовище	50	50	8	5	6	2
РРМ замочування протягом доби	50	50	42	40	37	15
Бланідас 300	100	100	81	32	44	18

\*скороченню «Н» відповідає назва сорту кизилу Нижний

\*\*скороченню «Е» відповідає назва сорту кизилу Екзотичний

Досліджено також вплив умов вирощування донорних рослин на кількість деконтамінованих експлантів серед живих (рис. 3.16). За цього дослідження використано кращі варіанти попередніх дослідів, а саме: відбір експлантів у фазу «зелений конус»; обробка Бланідас 300; в якості експлантів – бруньки із медіальної частини пагона.

В депозитарію, порівняно із звичайними «польовими умовами», в донорних рослин була менша інтенсивність освітлення, об'єкти знаходилися в закритому приміщенні (згідно ISO 14644-1:2015), тому контактування із контамінантами було обмежене. Також проводилися обробки як контактними так і системними фунгіцидами та бактеріоцидом казумін. Ці заходи та попередньо емпірично підібрані технологічні параметри дозволили



підвищити показники деконтамінації до 64 і 79 відсотків по досліджуваних сортах.

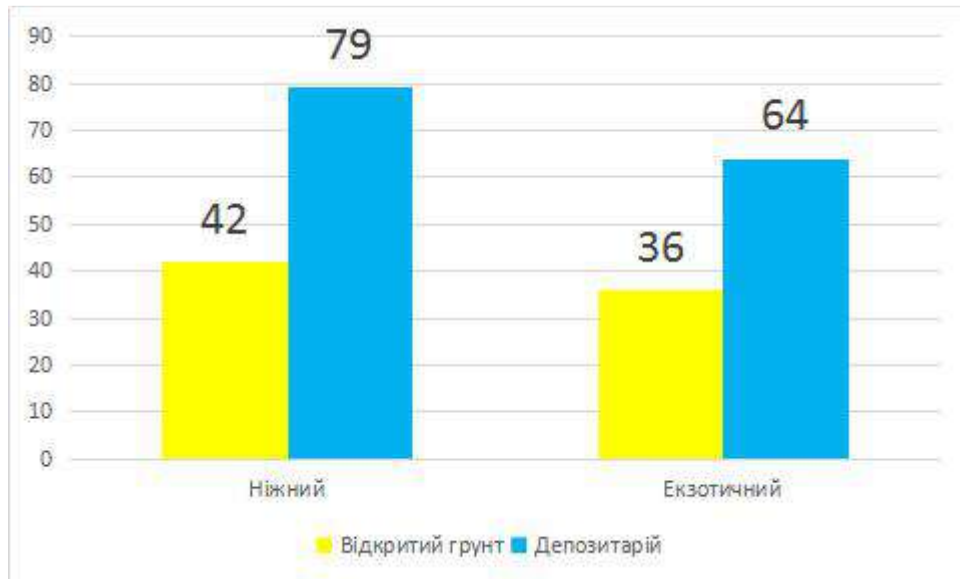


Рисунок 3.16 – Вплив умов вирощування донорів експлантів на ефективність деконтамінації, %

Поряд із зростанням ефективності деконтамінації встановили, що за ізоляції первинних експлантів з донорів відмічено відсутність фенолоподібного ексудату. Він чітко проявлявся на об'єктах ізольованих з «польових донорів». Припускаємо, що за умов штучного освітлення недостатньо світлової енергії для активації фенооксидазних систем [301].

Отже, на ефективність деконтамінації впливають:

- умови вирощування рослин-донорів первинних експлантів;
- різне походження експлантів за розміщенням на материнській рослині ;
- особливості контамінування того чи іншого виду рослин грибами та бактеріями;
- вид контактних та системних деконтамінатів.

Технологічно прийнятним виявився спосіб деконтамінації експлантів з обробкою експлантів гіпохлоритом натрію розведеним з автоклавованою дистильованою водою 1 до 2 з 2-3 кратним промиванням в стерильній воді та

занурення рослинних об'єктів в живильне середовище із біоцидом РРМ на 20 діб. Оптимальна концентрація препарату в живильному середовищі для експлантів ізольованих трав'янистих рослин 2,0 мл/л та 2,5 мл/л для деревних видів рослин.

Для практичного впровадження як основний деконтамінант рекомендується застосовувати суміш гіпохлориту натрію і перманганату калію або препарат Бланідас 300. За наявності бактеріальних контамінантів антибіотик левоміцитин; грибних – фунгіцид Превікур Енерджі, змішаних – біоцид РРМ.

### **3.3. Утворення регенерантами фенолоподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від умов та виду рослини**

Для удосконалення методики первинного субкультивування експлантів різних ботанічних видів (*Thuja occidentalis* 'Smaragd', *Miscanthus giganteus*, *Sclerocactus spinosior*, *Corylus avellana* L. та інші) досліджено природу утворення в них за перших пасажів фенолоподібних речовин.

**Фенолоутворення в регенерантів туї західної.** Під час оптимізації процесу тривалого МКР *Thuja occidentalis* 'Smaragd' нами встановлено вплив на фенолоутворення частини компонентів живильного середовища та стану експлантів. Для дослідження випробували різні види експлантів ізольованих в нативних умовах: верхівкові меристеми пагона (0,2-0,3 мм), живці, з однорічного приросту пагона, насіння, пагін проростка з двома хвоїнками, отриманий з насіння на перлітному субстраті (рис. 3.17).

Встановили залежність появи в середовищі фенольних ексудатів від виду експланта. Під час їх регенерації найменше виділення мало місце в результаті застосування насіння, що ще раз підтверджує раневу природу утворення фенольних сполук [144]. На інтенсивність фенолоутворення первинних експлантів із стеблових живців встановлено вплив наявності «пятки» (рис. 3.18).

Живці із п'яткою утворювали 95,4 % регенерантів без фенолів, а у випадку використання стеблових живців «без п'ятки» лише 7,9%.

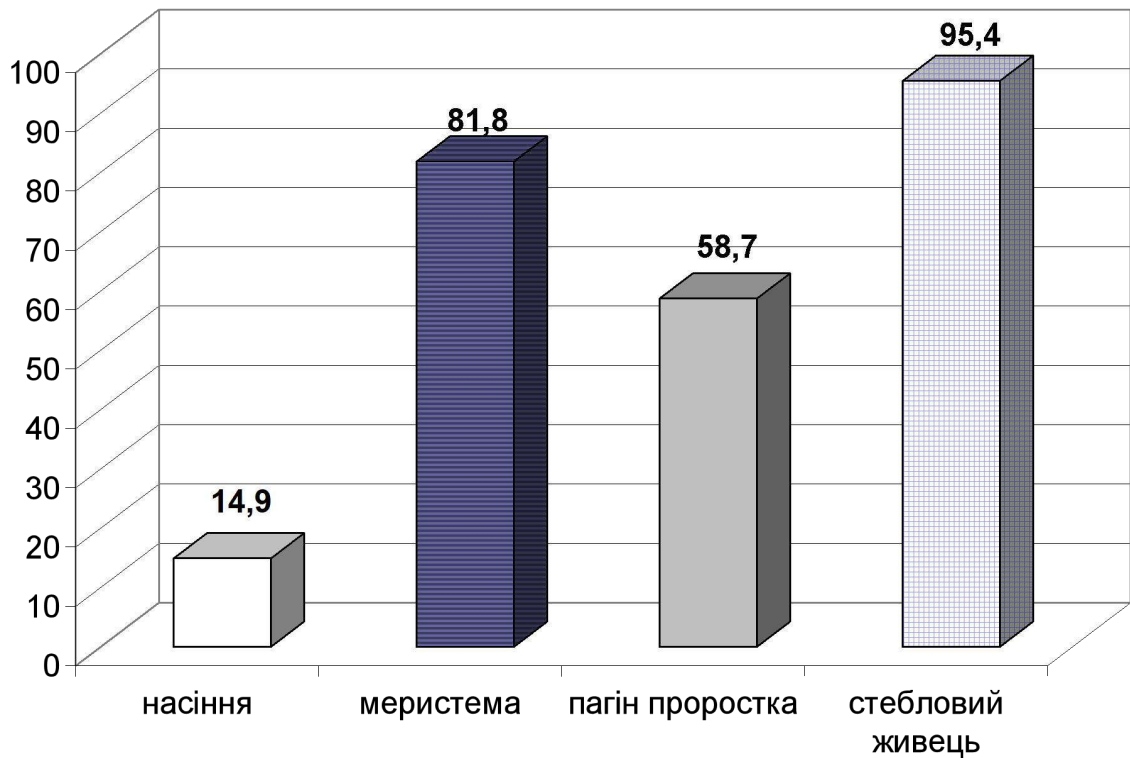


Рисунок 3.17 – Вплив виду експланта на виділення фенолоподібних речовин регенерантами *Thuja occidentalis* 'Smaragd' при введенні в асептичні умови



Рисунок 3.18 – Тип живця *Thuja occidentalis* 'Smaragd':

1 – з п'яткою; 2 – без п'ятки.

Індуктором утворення фенолів *in vitro* за живцювання (поранення рослин) є переважання цитокинів над ауксинами [72, 98], а тому нами в

живильному середовищі, замінено кінетин на аденін (табл. 3.18), що також має цитокінінову активність, але значно слабшу [92, 125].

Таблиця 3.18 – Вплив аденіну та кінетину на ефективність МКР *Thuja occidentalis* ‘Smaragd’

Варіант	Регеновано рослин, із 100 живців	Рослини мали, %			
		корені	пагони	корені і пагони	фенольні виділення
1. Контроль (без гормонів)	71,2	17,7	52,9	25,4	93,1
2. Кінетин 1 мг/л	64,1	11,3	76,4	12,3	97,3
3. Аденін 1 мг/л	73,2	15,8	48,1	36,1	91,7
4. Кінетин 1 мг/л + аденін 1 мг/л	57,2	4,3	87,9	7,8	98,4
5. Аденін 20 мг/л	89,5	8,5	14,7	76,8	24,9
6. Аденін 20 мг/л +15 мг/л аскорбінової кислоти*	97,3	1,7	3,2	95,1	3,8
НІР <sub>05</sub>	4,6	2,0	3,2	4,8	5,1

Примітка: \* в усіх варіантах, за винятком шостого, аскорбінова кислота добавлялась в кількості 1 мг/л

Встановлено, що ефект від застосування аденіну в концентрації 1 мг/л не відрізнявся від контролю (без гормонів). Сумісне використання цієї ж кількості аденіну з кінетином обумовлювало появу більшої кількості регенерантів з фенольними ексудатами. Досить часто такі регенеранти через 10-15 діб після живцювання відмирали. Вважаємо, що причиною цього була фітотоксичність вказаних виділень для рослин (самоотруєння). Вона проявлялась як у вигляді інтенсивного калюсоутворення, так і через вітрифікацію (гіпергідратація). Регенеранти, які виживали, як правило, не мали кореневої системи і характеризувались вкороченими пагонами.

Додавання лише аденіну (без кінетину) в концентрації 20 мг/л дозволило збільшити вихід регенерантів, порівняно з контролем, від 71,2% до 89,5%. Серед них була більша кількість з розвинутим пагоном та корінням і

зменшувалось до 24,9 % число регенерантів, що виділяли феноли в середовище.

Оскільки відомо, що аскорбінова кислота в рослинному організмі відновлює феноли до нетоксичних сполук [98], в подальшій модифікації середовища окрім додавання аденіну (20 мг/л) нами збільшена кількість аскорбінової кислоти з 1 мг/л до 15 мг/л. Це дозволило збільшити вихід регенерантів з експлантів і зменшити до 3,8 % кількість регенерантів з фенолоподібними виділеннями в середовище.

**Фенолоутворення старих листків міскантусу.** Появу фенолоподібних речовин можуть спричинити також відмираючі тканини експлантів. Так, за попередніми спостереженнями в процесі МКР міскантусу нами встановлено, що часто навколо регенерантів утворювались темні плями на живильному середовищі, які за літературними даними обумовлювались утворенням фенолоподібних сполук, які пригнічували розвиток рослин [98].

Для усунення цього явища випробувано ефективність видалення відмерлих листків з пагонів-експлантів (рис. 3.19, табл. 3.19).



Рисунок 3.19 – Видалення відмерлих листків міскантусу  
1 - ціла вихідна рослина;  
2 - обрізані експланти з видаленими відмерлими листками.

Таблиця 3.19 – Вплив видалення відмерлих листків на регенерацію живців міскантусу

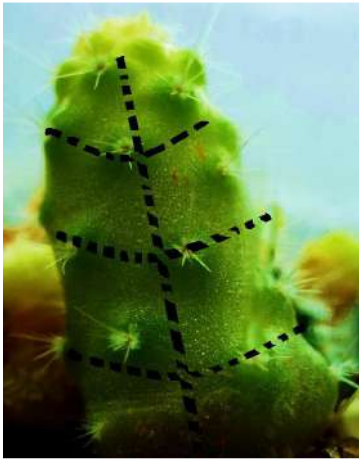
Видалення відмерлих листків	Висота рослин, мм	Кількість, шт.		Довжина кореневої системи, мм	Рослин, %	
		пагонів	коренів		з фенольними виділеннями	прижилося
без видалення (контроль)	54,50	1,40	5,57	59,00	4,75	94,50
з видаленням	62,25	2,18	4,08	62,75	1,25	97,53
НІР <sub>05</sub>	2,1	0,07	0,11	3,3	0,9	3,6

Це, зокрема, істотно збільшувало кількість пагонів у регенованих рослин з 1,40 до 2,18 шт., а також зменшувало число регенерантів, навколо яких утворювались фенольні плями, з 4,75 % до 1,25 %.

***Вплив площі раневої поверхні на інтенсивність утворення фенолів.***

Окрім розглянутих вище чинників на утворення фенолів впливає й величина раневої поверхні. Наприклад, за МКР *Sclerocactus spinosior ssp. Blainei* “schleseri” встановлено, що способи поділу материнської рослини на експланти впливали на регенерацію з них рослин та утворення фенольних плям у середовищі (рис. 3.20). За поділу стебла на шматки, де ранева ділянка становила  $\frac{1}{2}$  всієї поверхні, навколо експланта утворювались великі плями. Близько третини таких експлантів гинуло, а в інших відмічено інтенсивне калюсоутворення.

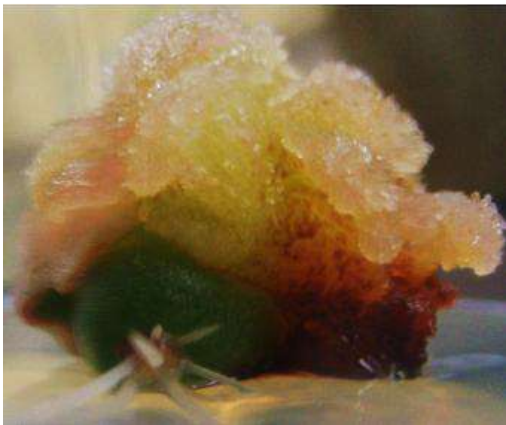
Експланти, що отримані шляхом ізоляції бруньок, і в яких ранева поверхня становила лише близько  $\frac{1}{10}$  від усієї поверхні, за 5-6 тижнів регенерували життєздатні пагоні. Вони після перенесення на середовище з 1,0 мг/л індолілмасляної кислоти формували кореневу систему і були готові до висаджування в закритий ґрунт.



Поділ на частини стебла



Поділ брунькуванням



Регенеранти з калюсом та фенольними виділеннями



Повноцінний регенерант, придатний для укорінення

Рисунок 3.20 – Вплив способу ізоляції експлантів *Sclerocactus spinosior ssp. Blainei* “schleseri” на регенерацію з низу рослин

Для дослідження використані рослини актинідії: *A. arguta* (сорт Оригінальна, Scarlet september); відібрані в НБС селекційні форми *A. chinensis* (жіночі форми № 1, № 2 та чоловіча форма) та *A. deliciosa* (відомі сорти Hayward і Atlas).

Для отримання асептичної культури первинних експлантів випробувано різні за місцем ізоляції експланти: апікальні (верхівкові) та медіальні (з середньої частини пагона). Встановлено, що їм властивий неоднаковий хід адаптації до асептичних умов та різна регенераційна здатність. Більш вираженими ці відмінності були у видів *A. chinensis* та *A. deliciosa*, менш виражені – у *A. arguta*. Верхівкові експланти, порівняно із медіальними, за умов успішної деконтамінації та застосування заходів



захисту від самоотруєнням фенолоподібними речовинами, швидко регенерували в рослини *in vitro*.

Відмічено вплив термінів ізоляції експлантів на регенераційну здатність рослин *in vitro*. Так, за першого відбору (весняного), порівняно з другим (літнім), відмінність була більш вираженою. До того ж в регенерантів першого відбору спостерігалась значна інтоксикація власним ексудатом. Особливо інтенсивне фенолоутворення за першого відбору було в експлантів *A. chinensis* апікального походження.

Використання аскорбінової кислоти та цистеїну, а також полівінілпіролідону дозволило зменшити фенолоутворення і, як наслідок, збільшити виживання експлантів у процесі введення рослин актинідії в асептичні умови (рис. 3.21). Зокрема, виживання за умови оптимального режиму деконтамінації в *A. chinensis* зростало з 9-27% до 56-64%.

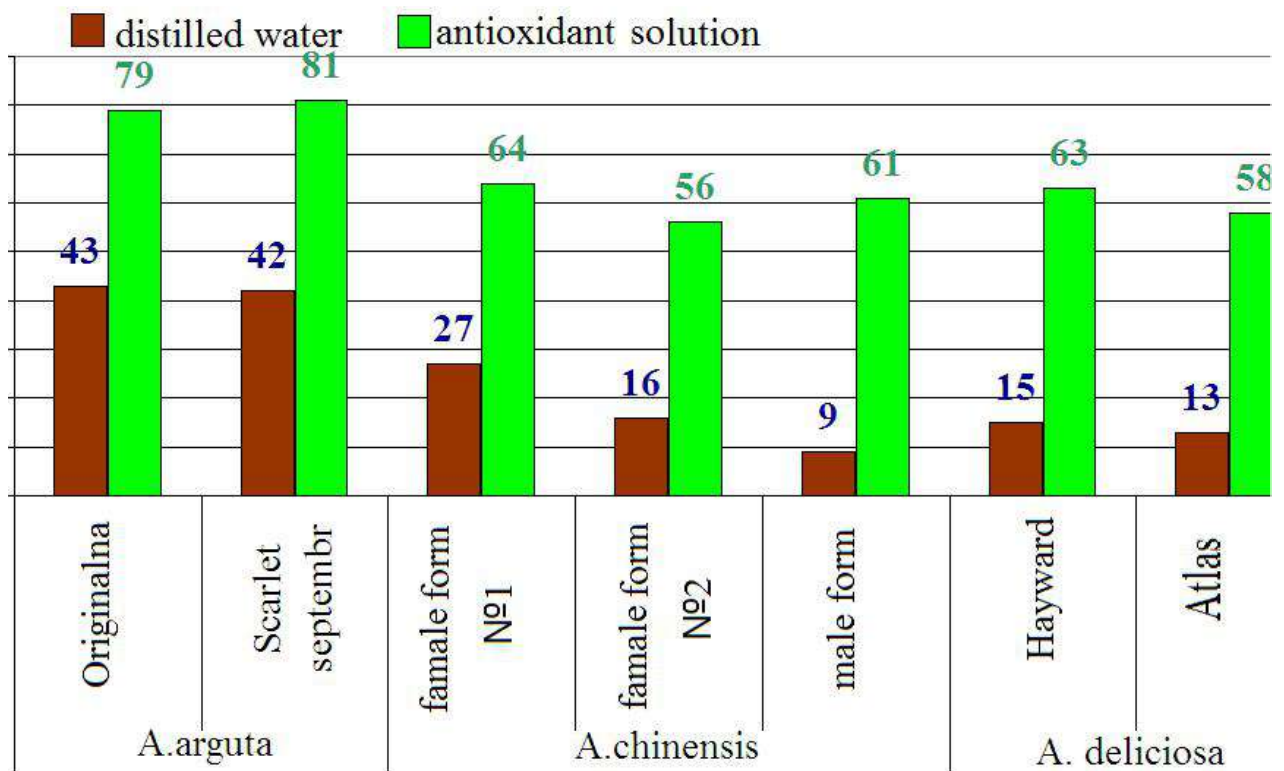


Рисунок 3.21 – Вплив розчину антиоксидантів на приживання експлантів актинідії, %



**Особливості захисту від фенолоутворенням за введення *in vitro* фундука.** Асептична культура фундука складна. Особливо проблемним є сильне контамінування та самоотруєнням фенолоподібними речовинами [238].

Нами проведено дослідження для усунення згаданого в процесі введення в культуру фундука стебловими експлантами (рис. 3.22):

- заміна гіпохлориту натрію на Бланідас 300, РРМ (Plant

Preservative Mixture);

- оптимізація стану експлантів; фундука

- коригування рН живильного середовища;

- часті пересадки;

- підбір експлантів (вік, форма);

- вирощування донорів експлантів в умовах закритого ґрунту із фунгіцидним захистом та на штучному розсіяному освітленні;

- оптимізація вмісту гормонів;

- зменшення площі раневої поверхні;

- застосування антиоксидантів;

- ювенілізація рослин донорів експлантів.



Рисунок 3.22 – Стеблові експланти фундука

Зміна технології деконтамінації шляхом додавання в живильне середовище 2,5 мл/л РРМ без попередньої обробки гіпохлоритом натрію мало методичні складнощі. Зокрема, на живильне середовище висаджували нестерильний матеріал, який міг контактувати як з інструментами (пінцети, ланцети тощо), так і культуральними ємностями. Це обумовлювало появу контамінуючих агентів у пробірках, які не контактували із деконтамінантами. У результаті цього відсоток втрат від прояву контамінантів у пробірках порівняно із варіантом, що передбачав застосування поряд із додаванням в

середовище РРМ обробку експлантів NaClO, зріс у сорту Трапезунд з 81 до 56% і в сорту Барселонський з 87 до 63%.

Водночас, зменшувалась кількість експлантів з опіками поверхневих тканин з 79 до 5 % у сорту Барселонський та з 67 до 9 % у сорту Трапезунд. Зміна лише підходу в деконтамінації не вирішувала проблему, в цілому. Експланти, які не мали опіків, все рівно утворювали фенолоподібні речовини, переважно в тканинах експлантів, хоча і менше виділялись в живильне середовище. Живці, бруньки, які виглядали зовні зеленими, при розтині мали через самоотруєння коричневі точки росту та листки, що крили меристемний купол (рис. 3.23).



Рисунок 3.23 – Відмирання точки росту та виділення фенольного ексудату в бруньки фундука

Одним із поширених заходів захисту від фенолоутворень запропоновані часті пересадки *in vitro*. Зокрема, це дозволило отримати морфогенні експланти троянди та грецького горіха [98]. Нами проведено пересадку експлантів з наступними інтервалами: 5, 10 та 15 діб (табл. 3.20). Встановлено, що часті пересадки вповільнювали відмирання експлантів. Однак на 45 добу лише за частих пересадок (через три доби) вижило 5 екплантів. Тому, тільки пересадками неможливо рішити проблему самоотруєння фенолоподібними речовинами.

За вирощування експлантів на середовищах з різним рН (від 5,0 до 6,5) виявлено, що в перші 15 діб найменше регенерантів із фенольним ексудатом відмічено за рН 6,0. Після цього періоду експланти все-таки гинули. На середовищі з рН 6,5 відмічено також поява хлорозів та відмирання верхівки.

Крім цього, за візуальними спостереженнями швидше утворювались і були більші за розмірами фенольні виділення у випадках великих за площею

ранових поверхнях. Інтенсивніше виділення ексудату відмічено в бруньок ізольованих з верхівки пагона.

Таблиця 3.20 – Вплив пересадок на фенолоутворення експлантів фундука

Інтервал пересадки, діб	Живих експлантів, %			Через 30 діб	Через 45 діб
	1 пересадка	2 пересадка	3 пересадка		
5	78	49	32	15	5
10	51	14	7	2	1
15	13	4	3	3	0
НІР <sub>05</sub>	5	6	3	3	1

Застосування антиоксидантного розчину (полівінілпіролідон + цистеїн) стримувало до трьох тижнів появу фенольного ексудату. Однак, застосування лише цього прийому не дозволило повністю вирішити проблему фенольної інтоксикації. Тому, нами розроблено і апробовано комплекс заходів підготовки донорських рослин в спеціальних умовах своєрідного «депозитарію». Це такі дії:

1. Вирощування рослин в умовах закритого ґрунту із освітленням 1,5-2,5 kLux.
2. Після висаджування рослин проводилась декапітація пагонів для пробудження бруньок.
3. Проведення фунгіцидних обробок з інтервалом 12-15 діб.

Впродовж 3-4 місяців донорські рослини утворюють пагони. Після пробудження на них бруньок (поява зелених кінчиків перших листків) брунькові експланти з п'ятками (рис. 3.24) витримували впродовж 2 годин в антиоксидантному розчині і переносили в стерилізуючий розчин з Бланідас 300.

4. Простерилізовані експланти висаджували на живильне

середовище (1/2 MS + 2,5-3,0 мг/л БАП).

5. Субкультивування *in vitro* проводили за визрівання бруньок в пазухах листків рослин-регенерантів.

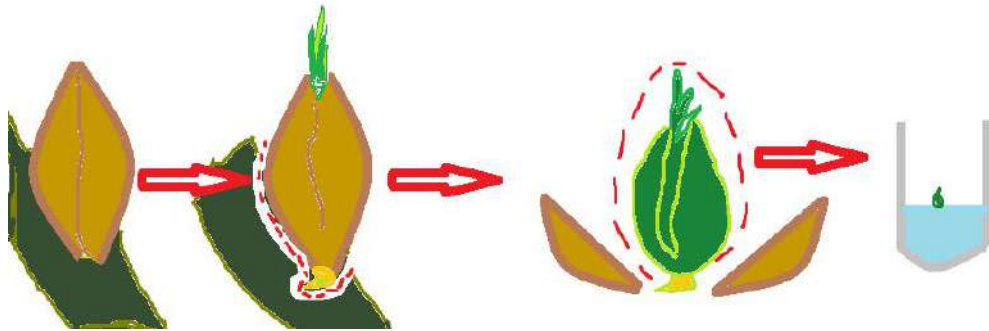


Рисунок 3.24 – Ізоляція брунькових експлантів фундука

Застосування вище згаданого комплексу заходів дозволило отримати високі показники деконтамінації та уникнути проблеми з самоотруєнням фенольним ексудатом (табл. 3.21).

Ефективність способу підготовки рослин донорів експлантів підтверджена на *Corylus colurna* та *Camellia japonica*.

Таблиця 3.21 – Ефективність застосування способу підготовки донорів експлантів *Corylus avellana*, %, на 45 добу спостереження

Сорт	Деконтамінованих		Живих		Із фенольним ексудатом	
	контроль	*підг.	контроль	*підг.	контроль	*підг.
Барселонський	6	78	0	73	94	0
Трапезунд	9	71	0	70	100	0
Україна 50	11	93	0	76	97	0

Примітка: \*скороченню «підг.» відповідає підготовка донорів експлантів перед ізоляцією експлантів

Отже, для уникнення самоотруєння фенолоподібним ексудатом рекомендується:

- підготовка рослин донорів експлантів

- ізоляція експлантів з мінімальними рановими поверхнями;
- ізоляція живців або бруньок із п'ятками;
- підбір речовин із цитокініноюю активністю з врахуванням фізіологічних особливостей біологічних об'єктів;
- видалення старих некротизованих тканин та органів;
- застосування антиоксидантів (аскорбінова кислота, цистеїн, рvр, активоване вугілля).

### 3.4. Сомаклональна мінливість

Регенерація рослин *in vitro* відбувається як прямим морфогенезом з уже існуючих бруньок, так і не прямим із бруньок чи ембріодів утворених *de novo*. Такі структури утворюють часто із травматичного калюсу або індукованого екзогенними гормонами (рис. 3.25, 3.26), наприклад, під час пошкодження стебла, черешка або листкової пластинки.



Рисунок 3.25 – Калюсоутворення на експлантах павловнії *in vitro*

Однією із потенційних проблем за введення в асептичні умови є поява сомаклонів. Нами спонтанно отримано з калюсу сомаклони трьохлистої павловнії, в результаті використання експлантами бутонів сортів хости з новим строкатим забарвленням (рис. 3.27).

Нами, від материнських рослин, що мали зелене й жовте забарвлення

отримано клони із повністю зеленим або повністю жовтим забарвленням. Зокрема соматклон На сорту Агалон повільноростучий, з ознаками карликовості, мав короткі черешки, листки менших розмірів, ніж у контролі, світло-жовтого, лимонного забарвлення. Кількість листків та пазушних бруньок переважала генетично стабільну форму в 1,5 – 2,0 рази.



Рисунок 3.26 – Калусоутворення на експлантах актинідії *in vitro*

Також в зміненої форми відмічено особливі вимоги до гормонів: рослини погано розвивались на середовищі без ауксинів. Листки ставали білими, із зневодненими краями. За додавання в середовище ауксину (ІМК 2-4 мг/л) розвиток нормалізувався до стану контрольних рослин які були без ознак мутації. Проблеми ауксинової природи обумовлювали утворення конгломерату із 15-25 дрібних пагонів без ознак ризогенезу. Натомість, такі регенеранти не реагували на додавання цитокініну БАП в межах від 0,5 до 3,0 мг/л.

Методом соматичного мутагенезу отримано власний клон, однією з характерних ознак якого є утворення у вузлі трьох листків, а не двох, як у аналогів (рис. 3.28). Робоча назва 112-3.





Рисунок 3.27 – Відмінності соматклубу хости сорту Агалон , порівняно з вихідною рослиною: 1. Контроль 2. Соматклуб Na



Вихідна форма Clone in Vitro 112



Отриманий соматклуб 112-3

Рисунок 3.28. – Мутація в павловнії

Отже, за мікроклонального розмноження непрямого морфогенезу хости, павловнії встановлено морфологічні та метаболітичні мутації регенерантів, тому для уникнення мутацій варто вибракувати рослини утворені цим шляхом.

### **Висновок до розділу 3**

Перший етап мікроклонального розмноження визначає швидкість та успішність проведення наступних. Встановлено ряд проблем та запропоновано шляхи удосконалення цієї частини технологічного процесу.

1. На прикладі шипшини, сортів троянди встановлений вплив на приживлення експлантів стану донорів. Кращим варіантом для всіх видів рослин виявилось використання «зеленого конусу», який передбачав ізоляцію бруньок з материнських рослин під час їх розпускання.

2. Доведений ефективний вплив на виведення з стану спокою рослин-донорів хости, троянди і ожини використання гібереліну. Порівняно з додаванням у живильне середовище (1 мг/л), вищий результат отримано за обробки материнських рослин розчином гібереліну в концентрації 0,1 г/л. Ненабагато поступався йому варіант з обробкою пагонів рослин-донорів аналогічною концентрацією.

3. У видів актинідії виявлено, що кращим місцем для виділення експлантів були апікальні частини пагона, порівняно з медіальними.

4. Через неоднаковий уміст пластичних, запасних і, особливо, біологічно активних речовин найкращими за здатністю утворювати пагони, коріння в туї західної виявилось використання пагонів проростка, що в 3,0 і 3,4 рази краще, ніж за використання меристеми. Для агапантуса краще приживлення експлантатів відмічене з основи суцвіття.

5. Виявлено, що для експлантів хости найкращим стерилізуючим комплексом виявилась суміш гіпохлорита натрію (суміш «Білизни» з водою 1:1) та перманганата калію 0,05 мг/л. Для усунення глибокого контамінування найбільш ефективною виявилась суміш левоміцетину (125



мг/л) та гентаміцин сульфату (80 мг/л). Крім використання найменш декантимінованої частини агапантуса – основа суцвіття доцільно використовувати як стерилізуючу речовину Превікур Енерджі 840 SL (3 мл/л).

6. Доведено, що вегетативне розмноження рослин-донорів агапантуса, порівняно з рослинами, що вперше квітували, підвищувало рівень контамінації експлантів. У туї західної таким матеріалом виявився стебловий живець, що порівняно з меристемою у 8,9 рази знижувало частку інфікованого матеріалу. У павловнії та підщепи GF-677 позитивний вплив на деконтамінацію мало видалення криючих лусок. Для чотирьох сортів хости менша частка контамінованих експлантів виявлена за використання донорами бутонів, порівняно з бруньками.

7. Встановлено, що особливість використання як стерилізуючої речовини біоциду РРМ для ожини та фундука – це необхідність повного занурення експлантів у середовище з концентрацією препарату 2 мл/л. Зменшення рецидивів та збільшення живих експлантів мало місце за 20-денного культивування рослин *in vitro*. Відмічено, що для різних життєвих форм оптимальна концентрація РРМ у середовищі неоднакова. У трав'янистих (цмин італійський, міскантус гігантський вона становила 2,0 мл/л), чагарникових (троянда, ожина – 2,5), а деревних (вишня, фундук) для отримання стерильних експлантів – 3,0, а живих – 2,5. За стерилізації двох видів верби (Інгер і прутovidна) ефективність стерилізації становила, відповідно, 90 і 96 %, що більше, ніж у контролі, в 15,0 і 5,1 рази.

8. За перших субкультивувань у туї західної, міскантуса, кактусів, актинідії, фундука, ліщини регенеранти утворювали фенолоподібні речовини, що негативно відбивалось на їх приживленні. У туї західної на процес впливали склад живильного середовища та стан експланту. Живці з «п'яткою» утворювали 95,4 % регенерантів без фенолів, а з «п'яткою» лише 7,9. Мінімальна частка експлантів з фенолами виявлена на середовищі з аденіном (20 мг/л) та аскорбінової кислоти (15 мг/л) – 3,8 % проти 93,1 у

контролі. У цьому варіанті також мала місце максимальна кількість регенованих рослин: 97,3 %, проти 71,2 у контролі. У міскантуса позитивний ефект отриманий за видалення відмерлих листків. Для трьох видів актинїдії дійовим заходом запобігання утворення фенолоподібних речовин виявилось використання верхівкових експлантів, порівняно з медіальними та занурення їх у антиоксидантний розчин: на 60 хв. аскорбінок кислоти (200 мг/л) + цистеїн (5 мг/л) і наступні 60 хв. в розчин полівінілпіролідону (10 г/л).

9. За введення в культуру фундука стебловими експлантати зменшення частки живців з фенольними виділеннями досягалось комплексом заходів: заміна в процесі стерилізації гіпохлориту натрію на Бланідас 300, або РРМ; використання частих пересадок; дотримання рН середовища 6,0; застосування антиоксидантних речовин; підготовка донорних рослин в умовах закритого ґрунту з фунгіцидним захистом, штучним розсіяним освітленням та видалення некротизованих тканин; зменшення площі раневої поверхні. Для ліщини відпрацьований дещо комплекс інших заходів.

10. Найчастіше соматональна мінливість під час субкультивувань регенерантів відмічалось у калюсній культурі та під впливом екзогенних гормонів. Вона проявлялась у виді зміни забарвлення: від зеленого до жовтого, уповільнення росту, зменшення кількості листків та пазушних бруньок, підвищення потреби в ауксинах.

За матеріалами досліджень розділу 3 опубліковано 21 наукову працю [4, 34, 111, 113, 115, 118, 128, 129, 134, 138, 139, 143, 144, 145, 146, 182, 183, 210, 215, 232, 234].

## РОЗДІЛ 4

### ЮВЕНІЛІЗАЦІЯ *IN VITRO*

Рослинам властиві різні рівні регуляції від окремої клітини до цілого організму. Це зокрема, генетичне, трофічне та гормональні регулювання. На відміну від тваринних рослинним організмам властиве, за особливих умов, повернення до програм генетичного регулювання, які є на ранніх етапах розвитку [221].

Під час МКР відбуваються зміни умов *in vivo* – *in vitro* – *ex vitro* – *in vivo* і рослини відповідно реагують, адаптуються. Змінюються умови навколо рослинних об'єктів, змінюється вміст екзо- та ендогенних гормонів, змінюється співвідношення гетеротрофного та автотрофних способів живлення. Набуття чи втрата ознак ювенільності, зміна регенераційного потенціалу це особливості реакції рослин на культивування *in vitro*, які притаманні усім етапам МКР.

#### **4.1. Зміна форм фотосинтезуючих органів туї в умовах *in vitro* та *ex vitro***

Однією із ознак ювенільності є специфічність морфології фотоасимілюючих органів – листків. Це можна спостерігати в багатьох ботанічних видів: суниці, картоплі, ожини, туї та інших. У деревних рослин, особливо деяких родів хвойних, виділяють ювенільні та звичайні фотосинтезуючі органи (листки, хвоя). Нами під час МКР *Thuja occidentalis* 'Smaragd' відмічено регенеранти з різними формами хвої. Так, одні мали лише голкоподібну (ювенільну), а інші лускоподібну і частково ювенільну форми (табл. 4.1, рис. 4.1). Встановлено залежність між формою хвої у вихідних рослин і ефективністю регенерації рослин з експлантів. Ті, що мали лускоподібну хвою регенерували рослини з меншими кореневою системою та кількістю пагонів.

Таблиця 4.1 – Вплив форм хвої експлантів на тривалість клонального мікророзмноження туї західної

Форма хвої експлантів	Коефіцієнт розмноження				Максимальна кількість субкультивувань, шт.
	субкультивування				
	перше	друге	третє	НІР <sub>05</sub>	
ювенільна	7,8	15,1	14,7	0,4	11 і більше*
лусковидна	4,1	3,2	0,5	0,3	4-5
НІР <sub>05</sub>	0,3	0,4	0,3	-	

Примітка: \* з 2006 по 2018 рік без втрат регенераційної здатності



Регенерант з ювенільною та лускоподібною хвою



Регенерант з ювенільною хвою

Рисунок 4.1 – Види регенерантів *Thuja occidentalis* 'Smaragd' за типом хвої

У подальших субкультуваннях регенеранти з лусковидною формою хвої втрачали здатність до розмноження.

Зокрема, через зменшення кількості пагонів та поганого їх вкорінення знижувався коефіцієнт розмноження.

Використання згаданого типу експлантів дозволило підтримувати в культурі тую західну лише впродовж 4-5

субкультувань. Добір для МКР вихідних рослин лише з ювенільною формою дозволив тривалий час тримати цей вид рослин в культурі *in vitro* – більше десяти років.

За постасептичного вирощування *in vivo* ці пробіркові рослини поступово набували лускоподібну хвою та типових ознак, властивих *Thuja occidentalis* 'Smaragd' (рис. 4.2). Тобто, створилися умови за яких відбувся повний перехід від ювенільного до наступного етапів розвитку. Отже, при введенні *in vitro* регенеранти туї західної набувають ознак ювенільності а за постасептичної адаптації їх втрачають.



Рисунок 4.2. – Зміна форми хвої за постасептичної адаптації впродовж 45 діб *Thuja occidentalis* 'Smaragd'

## 4.2. Гетеротрофне живлення і ювенілізація

Гетеротрофне живлення в звичайних умовах властиве початку життєвого циклу рослинного організму. Як впливає гетеротрофний спосіб життя рослин *in vitro* нами досліджено на прикладі картоплі, гвоздики. Картопля в нативних та асептичних умовах розмножується вегетативно. Однак, генезис листка залежить від трофічної регуляції та онтогенетичного віку рослинного організму. У відкритому ґрунті впродовж періоду вегетації на пагоні відбувається формування різних за формою листків (рис. 4.3). Зокрема, під час проростання бульб на поверхні ґрунту з'являються ювенільні листки з простою недиференційованою пластинкою. З часом простий листок перетворюється в складний розсічений.

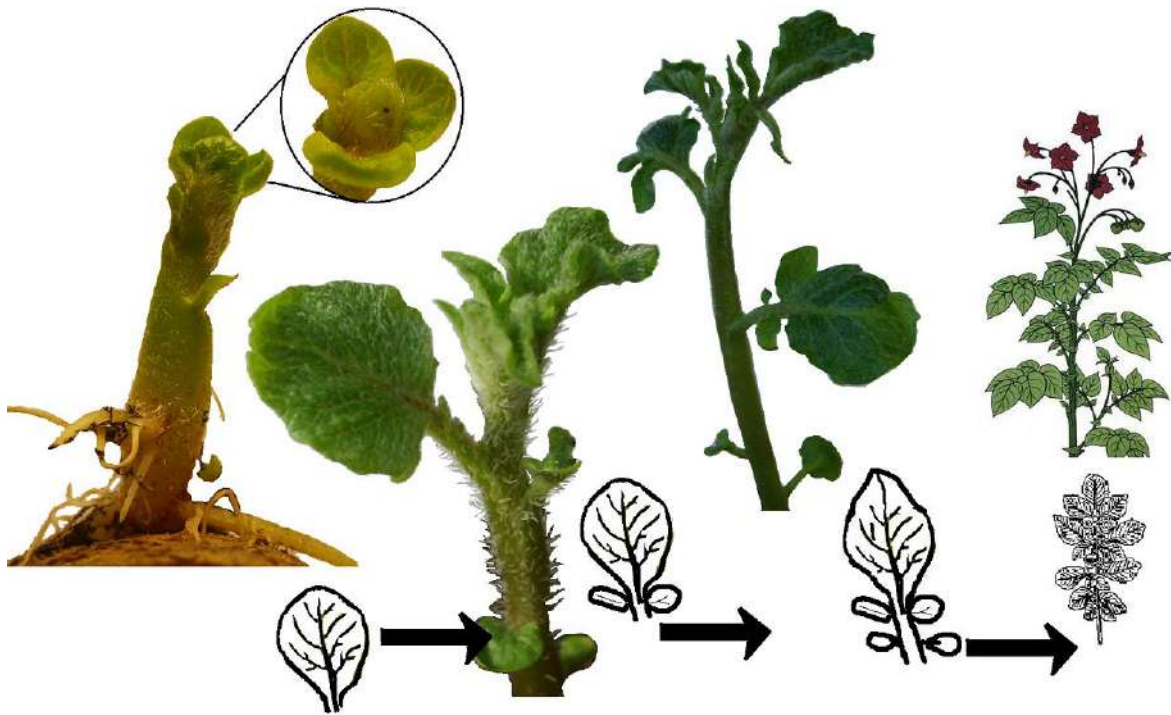


Рисунок 4.3 – Особливості формування листків рослин картоплі в звичайних умовах

Нами також встановлено ознаки ювенілізації у виду *Solanum tuberosum* L. За першого культивування із експланта-насінини утворювались ювенільні листки, а у випадку регенерації рослин із бруньок пагона *in vivo* формувались



типові перисто-розсічені листки (рис. 4.4). За подальшого субкультивування живцюванням утворювались регенеранти з ювенільними листками незалежно від того чи були регенеранти з бульбами, чи без них. Тобто, походження експлантів, умови культивування донорів впливало на фоліогенез листків *in vitro*.

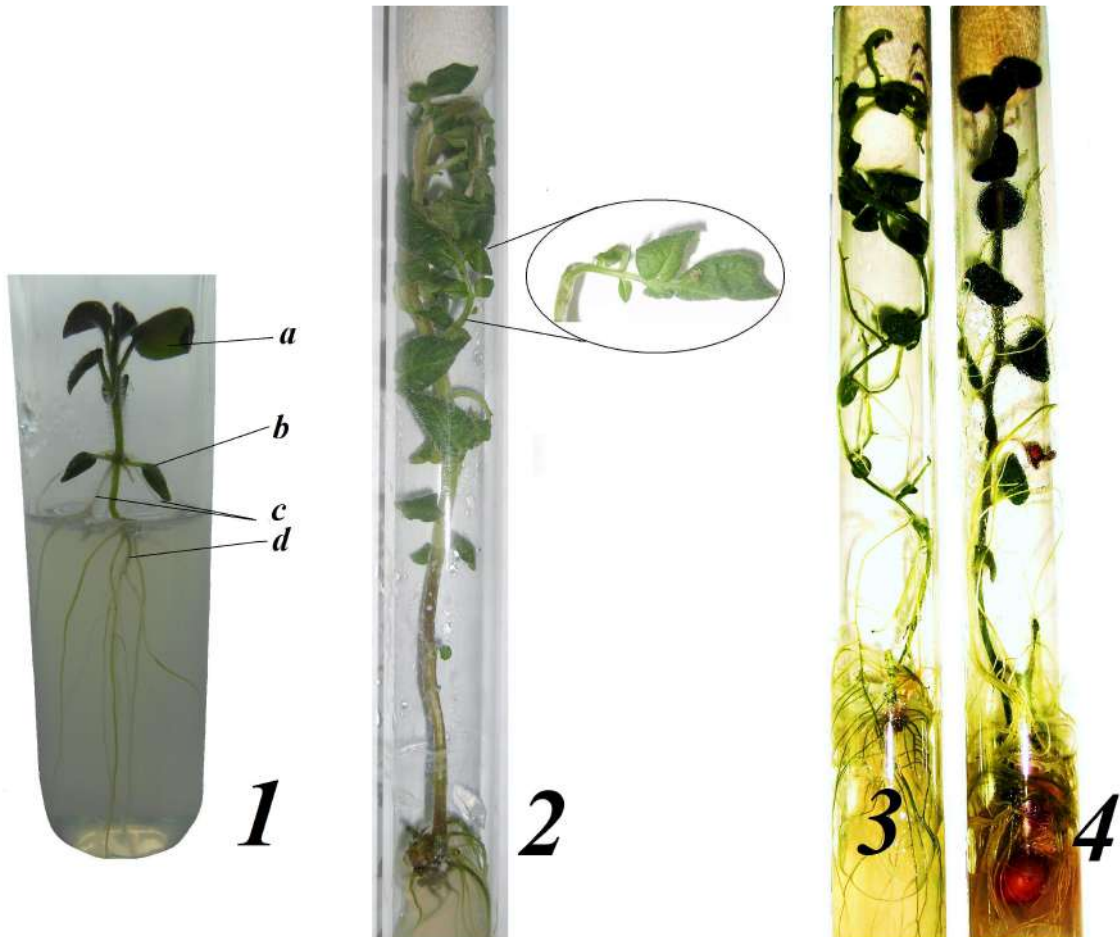


Рисунок 4.4 – Форми листків *Solanum tuberosum* залежно від походження експлантів:

1. В якості експланта використано насінину: а – ювенільні листки; б – ембріональні сім'ядольні листки; с – вторинна коренева система; d – зародкова коренева система.
2. В якості експланта використано бруньки *in vivo*.
3. Рослина-регенерант після субкультивування
4. Рослина-регенерант після субкультивування на середовищі з індукторами бульбоутворення

На штучних живильних середовищах *in vitro* з сахарозою формувались прості невеликі листки за зовнішнім виглядом схожі на ювенільні у відкритому ґрунті. Існує припущення, що причиною пригнічення розвитку

регенерантів є невелика місткість культурального посуду [98]. Однак, якщо збільшити місткість з 40 мл до 500 мл (більш як в 10 раз) регенеранти за розвитком листкової пластинки все-таки не відрізнялись (рис. 4.5).

Раніше встановлено, що за культури *in vitro* в регенерантів формувалась проста, майже не розсічена пластинка, а за послідуєчих пасажів в умовах закритого ґрунту, розсіченість листкової пластинки посилюється. Причиною цього може бути поступова індукція переходу апікальних меристем від вегетативного до генеративного періоду онтогенезу [230].

Під час культури меристем та МКР, у цілому, відбувається індукція процесів дедиференціювання і подальшої проліферації клітин через перепрограмування геному, “ювенілазація” його стану [92], Ювенільність підтримувалась у культурі тканин тривалий час. Наприклад, рослини картоплі *in vitro* в Інституті картоплярства НААН багатьох сортів підтримувались 5-10 і більше років [109] і весь цей час листки в рослин мали прості недиференційовані пластинки, подібні тим, які в нативних умовах властиві картоплі під час початкових ювенільних етапів онтогенезу. Таким чином, в асептичних та нативних умовах рослинам властиве гетеротрофне живлення, за рахунок запасних поживних речовин бульби або сахарози штучного живильного середовища.



Рисунок 4.5 – Культивування картоплі *in vitro*:

1. культуральна ємність 40 мл;
2. культуральна ємність 500 мл.



Вплив автотрофного і гетеротрофного живлення на формування листкової пластинки і розвиток регенерантів, в цілому, є актуальним з практичної та теоретичної точок зору. Тому, нами проведено дослідження за наступною схемою. Рослини *in vitro* висаджували: 1) без сахарози, 2) з 3 % сахарозою, 3) з 6 % сахарозою, 4) з 9 % сахарозою (табл. 4.2). За вказаною схемою проводили три субкультування методом накладання. Оскільки агар-агар є полісахаридом [98] усунення впливу його, як джерела гетеротрофного живлення, рослини вирощували на рідкому живильному середовищі. Повторність дослідження чотириразова, по 30 регенерантів у кожному повторенні.

Таблиця 4.2 – Вплив екзогенної сахарози на розвиток пагона картоплі *in vitro*

Кількість сахарози, %	Площа листків, мм <sup>2</sup>			Висота пагона, мм		
	1*	2	3	1	2	3
сорт Подолянка						
0	380±3,5	238±2,2	103±5,2	126±1,8	93±1,7	61±3,1
3	331±2,1	340±2,4	322±7,9	139±2	131±2,2	143±1,6
6	142±2,7	80±2,5	65±2,2	132±2,6	128±2	106±2,1
9	39±1,2	28±1,1	23±2	88±1,7	63±1,7	48±2
сорт Слов'янка						
0	413±6,8	251±3,9	121±2,4	135±2,4	92±2	74±1,9
3	337±3,3	332±4,9	341±2,8	168±7	176±2,3	165±3
6	154±4,1	93±2,65	77±1,1	142±2,4	110±2,8	104±2,1
9	68±4,3	37±1,6	18±1,2	103±2,4	71±2,1	53±1,7

Примітка: \*1, 2, 3 пасажування (субкультування)

Встановили, що різні концентрації сахарози в живильному середовищі обумовлювали різний розвиток регенерантів картоплі та гвоздики (рис. 4.6, 4.7). Найбільші листкові пластинки формувались у регенерантів, вирощених

на середовищі без сахарози. Так в картоплі сорту Подольянка площа листків у регенерантів на середовищі без сахарози за першого пасажування становила 380 мм<sup>2</sup> на одну рослину. Додавання трьох відсотків сахарози обумовлювало зменшення площі листків до 331 мм<sup>2</sup>. Найменшою у досліді вона була за додавання в середовище найбільшої кількості сахарози (9 %) - 39 мм<sup>2</sup>, що становило лише 11,8 відсотків від площі листів у регенерованих рослин без сахарози. Подібна тенденція встановлена і в регенерантів сорту картоплі Слов'янка: із збільшенням кількості сахарози зменшувалась площа листків з 413 мм<sup>2</sup> до 68 мм<sup>2</sup>. У останньому випадку вона становила лише 16,5 % від площі в регенерованих рослин без екзогенної сахарози. У регенерантів гвоздики також відмічена подібна тенденція, що видно на рисунку 4.7.

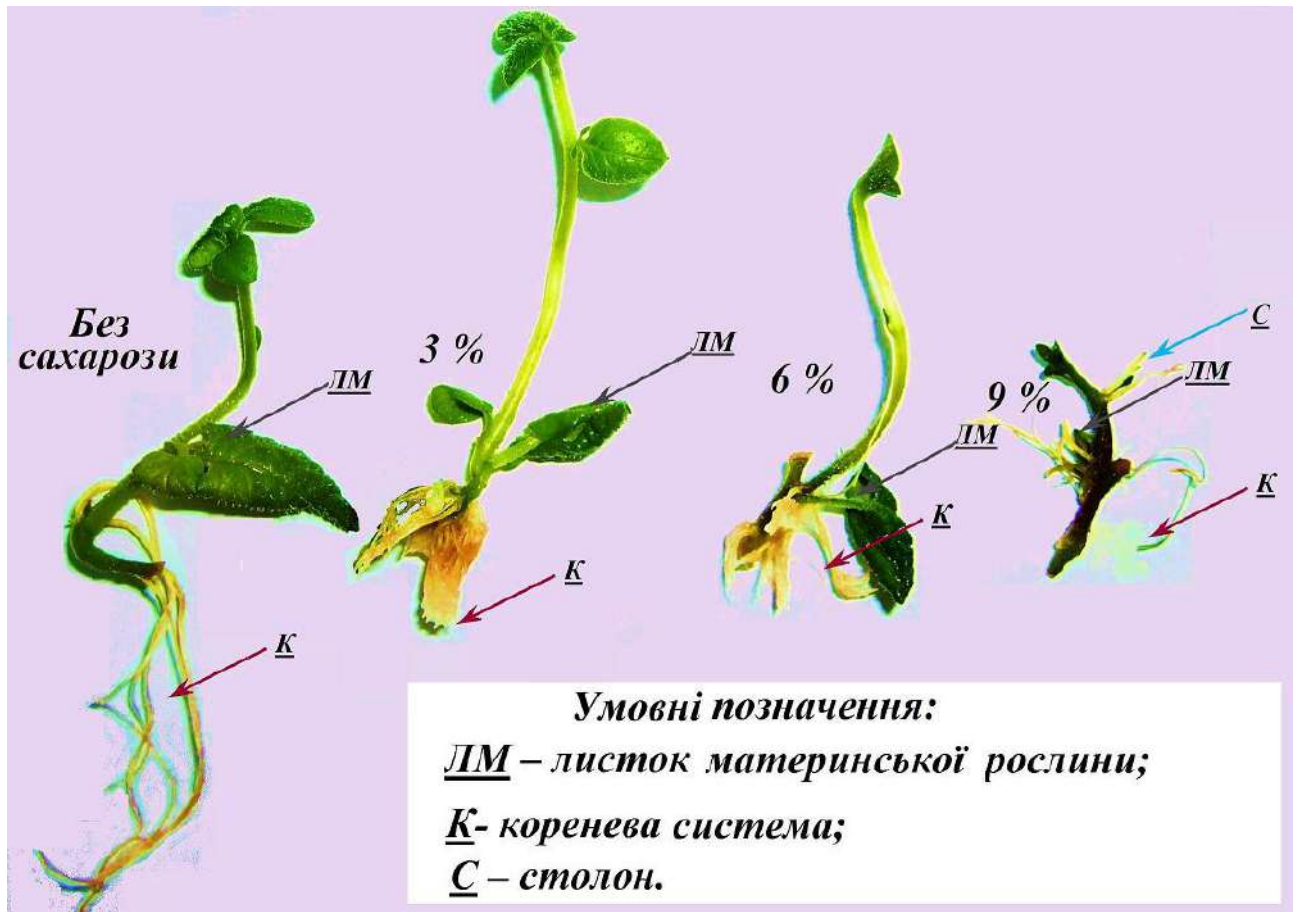


Рисунок 4.6 – Розвиток регенерантів картоплі *in vitro* залежно від концентрації сахарози (1-й пасаж)

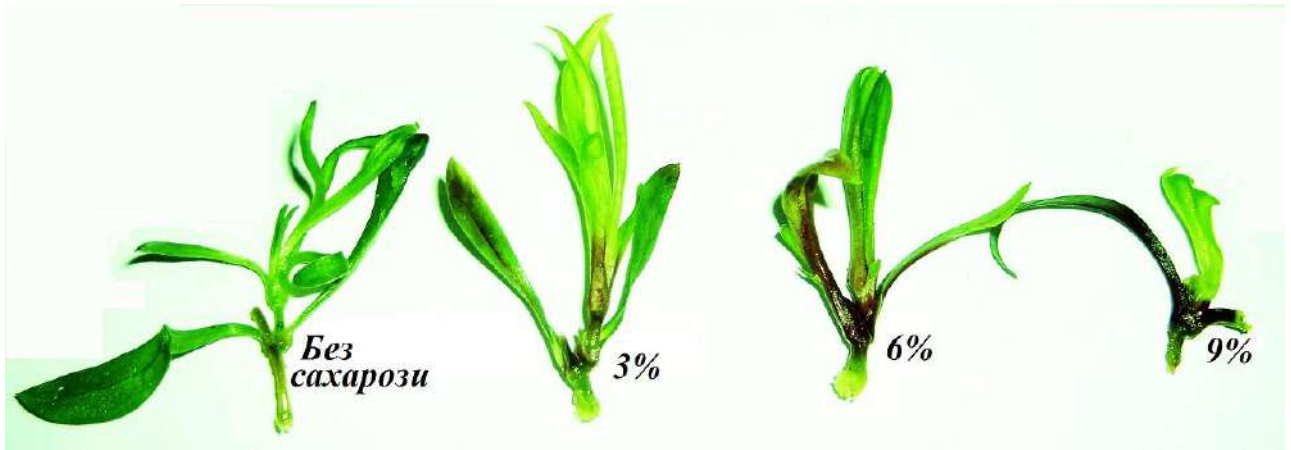


Рисунок 4.7 – Розвиток регенерантів гвоздики *in vitro* залежно від концентрації сахарози (1-й пасаж)

Також відбулись зміни листків, які регенерант “отримав” від материнської рослини. Відсутність сахарози, як джерела гетеротрофного живлення, індукувало активізацію росту листків, про що свідчило збільшення їх розмірів. У регенерантів, вирощених на середовищах з сахарозою, не відмічено збільшення площі листків. Вважаємо, що величина материнських листків на середовищі без сахарози пов’язана з потребою в автотрофному живленні. За гетеротрофного живлення (середовища із екзогенною сахарозою) у рослині відсутній “стимул” росту фотосинтезуючих органів.

З кожним наступним субкультивуванням, за виключенням варіанту з додаванням 30 г/л сахарози, площа листків зменшувалась. У сорту Подолянка без сахарози вона знизилась з 380 мм<sup>2</sup> за першого культивування до 103 мм<sup>2</sup> за третього культивування. За цих умов також змінювалась форма листової пластинки (рис. 4.8).

В умовах *in vitro* відмічені також зміни інтенсивності ризогенезу (табл. 4.3). Регенеранти без сахарози в штучному живильному середовищі формували довшу кореневу систему, однак кількість коренів була меншою. Найбільша кількість коренів відмічена за регенерації рослин картоплі обох сортів на середовищі з трьома відсотками сахарози.

Отже, відсутність поліморфізму листової пластинки в регенерантів за умов МКР свідчить, що сукупність ендогенних чинників пригнічує їхній

перехід від вегетативного до генеративного розвитку. Це зумовлено, в значній мірі, гетеротрофним типом живлення регенерантів.



Рисунок 4.8 – Зміни форми листкової пластинки та розвитку кореневої системи в регенерантів вирощених на середовищі без сахарози залежно від кількості субкультивувань (1. – 1-й пасаж, 2. – 3-й пасаж).

Таблиця 4.3 – Вплив екзогенної сахарози на ризогенез у регенерантів картоплі *in vitro*

Кількість сахарози, %	Довжина кореневої системи, мм			Кількість коренів, шт.		
	1*	2	3	1	2	3
сорт Подолянка						
0	119±2	43±1,6	31±1,1	5,4±0,1	3,1±1,2	1,8±0,3
3	97±2,0	101±2,2	95±1,7	11,3±0,2	11,0±0,2	11,4±0,2
6	80±2,8	68±1,5	46±1,9	7,2±0,2	7,0±0,9	6,1±0,2
9	12±1,2	7±1,1	3±0,6	3,1±0,2	2,7±0,1	1,2±0,1
сорт Слов'янка						
0	134±2,8	86±2,8	33±2,7	6,2±0,2	3,6±0,1	2,4±0,2
3	118±2,3	113±6	121±2,1	13,2±0,2	13,4±0,1	12,9±0,3
6	91±2,7	61±2,5	57±1,3	9,4±0,3	6,3±0,3	4,5±0,1
9	23±2,1	14±0,8	6±0,6	3,2±0,1	2,5±0,1	1,6±0,1

Примітка: \*1, 2, 3 пасажування (субкультивування)

### 4.3. Аерація і особливості міксотрофного живлення

Аерація один з вагомих чинників, які впливають як на особливості міксотрофного, фотоавтотрофного живлення, так і особливості регенерації рослин. Нами вирощено рослини картоплі за наступних умов (рис. 4.9):

1 – міксотрофне живлення з переважанням гетеротрофного обумовлене наявністю сахарози та слабкою аерацією повітря навколо пагона через ускладнення доступу повітря з причини закривання пробірок ватно-марлевими пробками (контроль);

2 – фотоавтотрофне живлення (без сахарози) та слабка аерація повітря;

3 – міксотрофне живлення (з сахарозою) та вільний доступ повітря до пагона;

4 – фотоавтотрофне живлення (без сахарози) та вільний доступ повітря до пагона

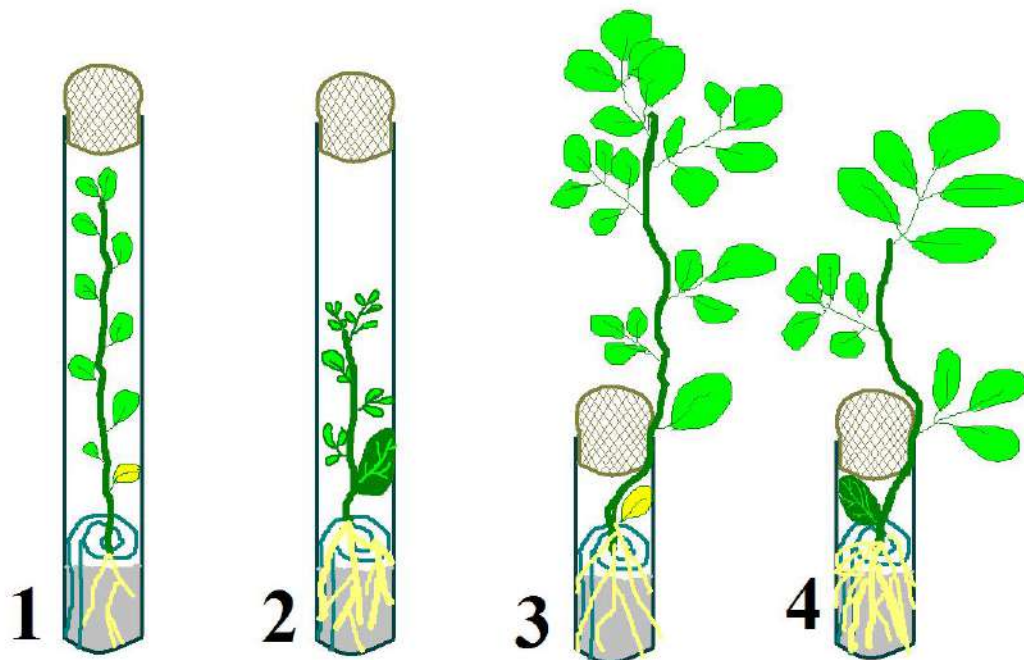


Рисунок 4.9 – Вплив аерації повітря та способів живлення на формування листків картоплі: 1 – у закритій пробірці з сахарозою (*in vitro*); 2 – в закритій пробірці без сахарози (*in vitro*); 3 – пагін з вільним доступом повітря, коренева система *in vitro* в середовищі з сахарозою; 4 – пагін з вільним доступом повітря, коренева система *in vitro* у середовищі без сахарози.

Виявили, що за наявності сахарози та слабкої аерації регенеранти мали прості ювенільні листки. Ці рослини впродовж періоду культивування в 30 діб досягали верхньої частини пробірки (20 см). За відсутності сахарози у варіанті 2 регенеровані рослини були на 1/3 нижчими та мали ознаки утворення складних листків. Тобто, з однієї сторони відсутність сахарози, як джерела гетероавтотрофного живлення, стимулювала рослин диференціювати листок для поліпшення фотосинтезу, а з іншої – слабка аерація, яка призводила до уповільнення надходження вуглекислого газу і тим самим зменшувала надходження пластичних речовин, що стало причиною меншого темпу росту рослин, порівняно з контрольними. Якщо таким рослинам забезпечували вільний доступ повітря вони мали ще більше диференційовані листки і довший пагін (варіант 4). Найбільший він за висотою сформувався за міксотрофного живлення з вільним доступом повітря.

Підвищення аерації стимулювало кращий розвиток кореневої системи. Вважаємо, що при інтенсифікації фотосинтезу збільшується потреба пагона в воді та розчинених в ній речовинах. Це насамперед: транспорт поживних речовин, транспірація та залучення протонів водню в синтез органічних речовин.

Таким чином, вище вказане підтверджує, що гетеротрофне живлення та повільна аерація повітря навколо регенеранта є одними із причин утворення *in vitro* ювенільних листків, які притаманні початковим етапам онтогенезу. Однак, зустрічаються випадки, коли такі рослини можуть у подібних умовах переходити до наступних етапів онтогенезу, в тому числі й до цвітіння. Наприклад, нами за загущеного вирощування троянд (сорти Авеланж, Тукан), встановлено, що в них утворювались не ювенільні прості листки, а складні розсічені і за 1,5 – 2,0 місяці вони зацвітали. Живці взяті з таких рослин регенерували слабке потомство і передчасно старіли.

Подібна ситуація відмічена і за загущеного вирощування регенерантів смородини (рис. 4.10.). Вважаємо, що причиною цього є утворення етилену



за наявності великої кількості рослин та слабкої аерації (Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A., 2005), що прискорює розвиток тканин, їх старіння і передчасне відмирання.



Рисунок 4.10 – Особливості розвитку регенерантів смородини: зліва рослини вирощені на середовищі із інгібітором етилену ( $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ ); справа – без інгібітора етилену; внизу – старіння та відмирання листових пластинок рослин отруєних етиленом.

Отже, наявність сахарози, повільний доступ вуглекислого газу обумовлюють гетеротрофне живлення та утворення ювенільних листків, а у

випадку загушення посадки в культуральних ємностях слабка аерація є причиною отруєння регенерантів етиленом.

#### 4.4. Вплив екзогенних вуглеводів на утворення запасуючих органів

Тип вуглеводного живлення регенерантів *in vitro* також впливав і на бульбоутворення (табл. 4.4). Так, за автотрофного живлення утворювалась найменша кількість мікробульб. Ця закономірність посилювалась з кожним наступним субкультуванням.

Таблиця 4.4 – Вплив екзогенної сахарози на бульбоутворення регенерантів картоплі *in vitro*

Кількість сахарози, %	Кількість мікробульб з рослини, шт.			Маса мікробульб з рослини, г.		
	1*	2	3	1	2	3
сорт Подолянка						
0	0,7±1,4	0,4±0,1	0,2±0,1	0,07±0,02	0,05±0,02	0,01±0,01
3	1,9±0,1	2,0±0,3	1,8±0,2	0,28±0,01	0,27±0,01	0,29±0,01
6	2,3±0,1	2,4±0,2	2,3±0,3	0,32±0,01	0,38±0,02	0,24±0,01
9	2,4±0,2	2,3±0,1	1,2±0,1	0,42±0,01	0,43±0,01	0,11±0,01
сорт Слов'янка						
0	1,0±0,2	0,6±0,1	0,5±1,7	0,20±0,04	0,13±0,04	0,09±0,04
3	2,3±0,3	2,4±0,1	2,2±0,2	0,49±0,01	0,46±0,01	0,50±0,01
6	2,9±0,3	3,4±0,2	2,1±0,1	0,73±0,01	0,69±0,01	0,51±0,01
9	3,2±0,2	3,4±0,2	1,9±0,1	0,61±0,01	0,65±0,01	0,21±0,01

\*1, 2, 3 пасажування (субкультування)

Додавання в середовище великої кількості сахарози (60 і 90 г/л) індукувало утворення значно більшої кількості бульб, порівняно з автотрофним типом живлення і трьома відсотками сахарози. Оптимальною для бульбоутворення серед досліджуваних кількостей сахарози для сорту



Подолянка було 60 г/л, а для сорту Слов'янка – 90 г/л. Отже, кількість мікробульб сортів Подолянка і Слов'янка залежала від концентрації в живильному середовищі екзогенної сахарози.

За вказаних вище концентрацій сахарози в регенерантів картоплі за трьох послідовних субкультивувань відбулись зміни в формі листкової пластинки. При першому живцюванні регенерантам всіх варіантів була властива проста не розсічена пластинка. Однак, за третього пасажу під час автотрофного живлення відбувалася диференціація листкової пластинки. На нашу думку, зміни форми листкової пластинки під час автотрофного живлення пов'язані з індукцією переходу регенерантів до наступних етапів органогенезу. Одним з індукторів цього може бути утворення абсцизової кислоти, що синтезувалась за автотрофного живлення внаслідок розпаду одних з пігментів фотосинтезу – ксантофілів [94].

Отже, за впливу індукуючих умов рослини картоплі переходять до бульбоутворення і змінюється генезис листкової пластики.

#### **4.5. Вплив умов культивування *in vitro* на фоліогенез регенерантів хости**

Окрім картоплі поліморфізм листків досліджено ще на одному ботанічному виді рослин – хості. Встановили, що за морфологічними ознаками рослини хости *in vitro* відрізняються від тих, що ростуть *in vivo*. Окрім зменшення розмірів та набуття ознак ювенільності в рослин змінювалась форма, забарвлення листків. Згідно з нашими даними лише за культивування впродовж 1-2 місяців у теплиці рослини хости *in vitro* набували типових ознак сорту *in vivo*.

Доведений вплив на форму і розміри листків хости концентрації елементів живлення (рис. 4.11). Порівняно із контролем (MS повна концентрація), зниження кількості мінеральних елементів у середовищі в два рази (MS<sub>1/2</sub>) обумовили зменшення числа листків, вкорочення і округлення листкової пластинки, і довжини та товщини черешка. Вказані зміни

проявлялись в зменшенні діаметру базальної ділянки пагона із 8,0-10,0 мм у контролі до 3,5-4,5 мм, що в свою чергу погіршувало технологічність поділу регенерантів на експланти під час живцювання *in vitro*. Також відмічене зменшення з 2,3 до 1,4 шт. кількість пагонів на рослину, тобто знижувався коефіцієнт розмноження.

Додавання в середовище ауксину (ІМК, 4 мг/л) поряд із індукцією ризогенезу спричиняло подовження черешка листка. З приводу цього, вважаємо, що причина викладеного в стимуляції ксилемоутворення ауксинами [147а, 27] і, як наслідок, збільшення ксилемної складової черешка його товщини, в цілому.

Додавання активованого вугілля також обумовлювало утворення вкороченої, овальної за формою, листової пластинки, але розміри листків збільшувались, порівняно із регенерантами, вирощеними без цього компонента (рис. 4.12).

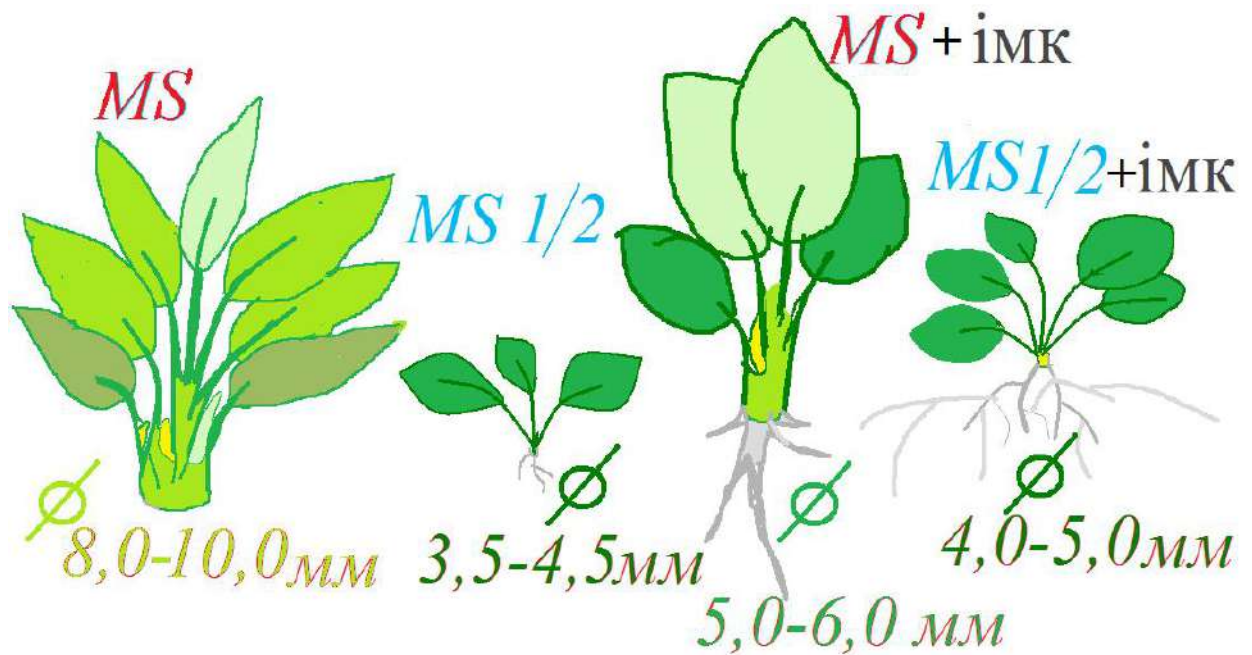


Рисунок 4.11 – Вплив концентрації мінеральних елементів на морфогенез регенерантів хости

Примітка: скороченню **MS** відповідає середовище Мурасіге і Скуга, повна концентрація; **MS1/2** – середовище Мурасіге і Скуга, половинна концентрація; **ІМК** – додавання індолілмасяної кислоти (4 мг/л); Ø – діаметр прикореневої зони пагона.

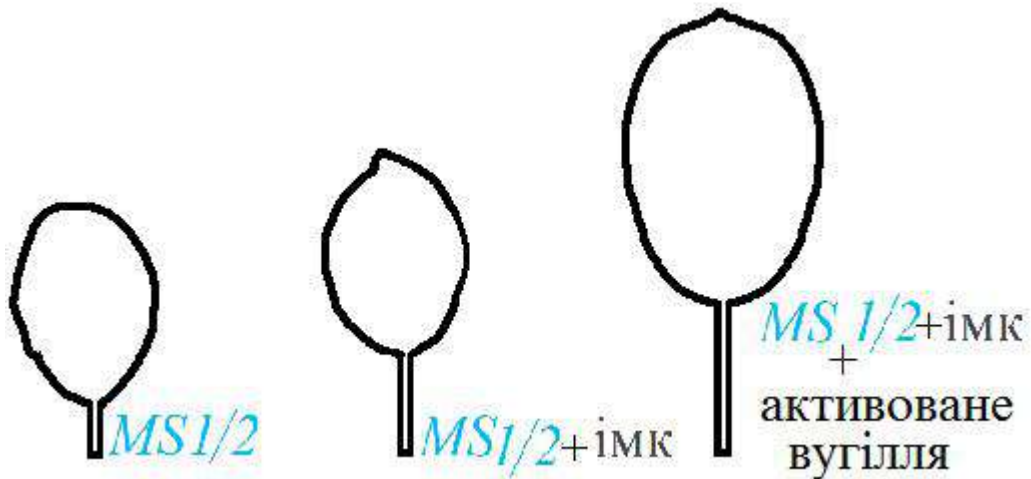


Рисунок 4.12 – Вплив індолілмасляної кислоти та активованого вугілля на зміну листка

Примітка: скороченню **MS** відповідає середовище Мурасіге і Скуга, повна концентрація; **MS1/2** – середовище Мурасіге і Скуга, половинна концентрація; **IAA** – додавання індолілмасляної кислоти (4 мг/л).

Поряд зі зміною розмірів листя встановлено і відмінності його пігментації, що проявлялось, наприклад, у строкатолистих форм хости (сорті Патріот, Вайт Брім). На середовищі із половинною концентрацією мінеральних елементів живлення строкатолистість проявляється чітко. Додавання ауксину сприяло зміні забарвлення ділянок із білим кольором на світло салатовий. На середовищі з повним набором мінеральних елементів (контроль) ці ділянки листка набували світло зеленого кольору і майже не виділялись на загальному фоні листкової пластинки.

Відмічено також пригнічувальну післядію вирощування вихідних для живцювання рослин на збідненому середовищі ( $MS_{1/2}$ ). Таке потомство за біометричними показниками поступалось контролю (рис. 4.13).

Порівняння морфогенезу регенерантів хости на середовищах з різною концентрацією агар-агару 0,7% (контроль), 0,9% (загущене), 0,5% (зріджене), встановлено, що на генезис листків впливає консистенція середовища (рис. 4.14). На зрідженому середовищі рослини формували в 2-2,5 рази довші і водночас 1,5-2,0 рази вужчі листкові пластинки.

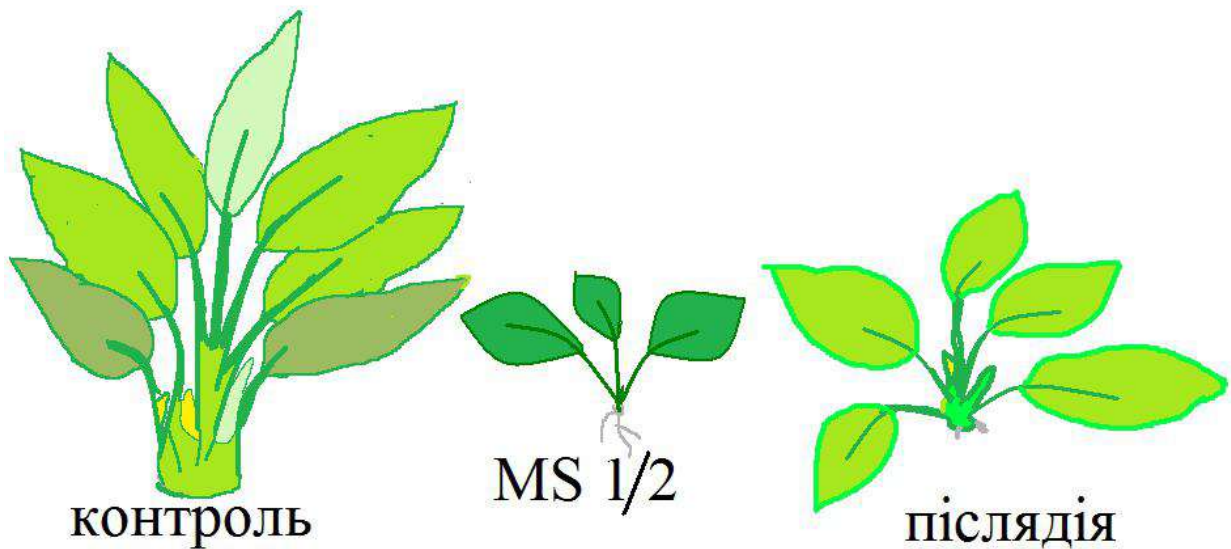


Рисунок 4.13 – Післядія вирощування вихідних для живцювання рослин на збідненому середовищі

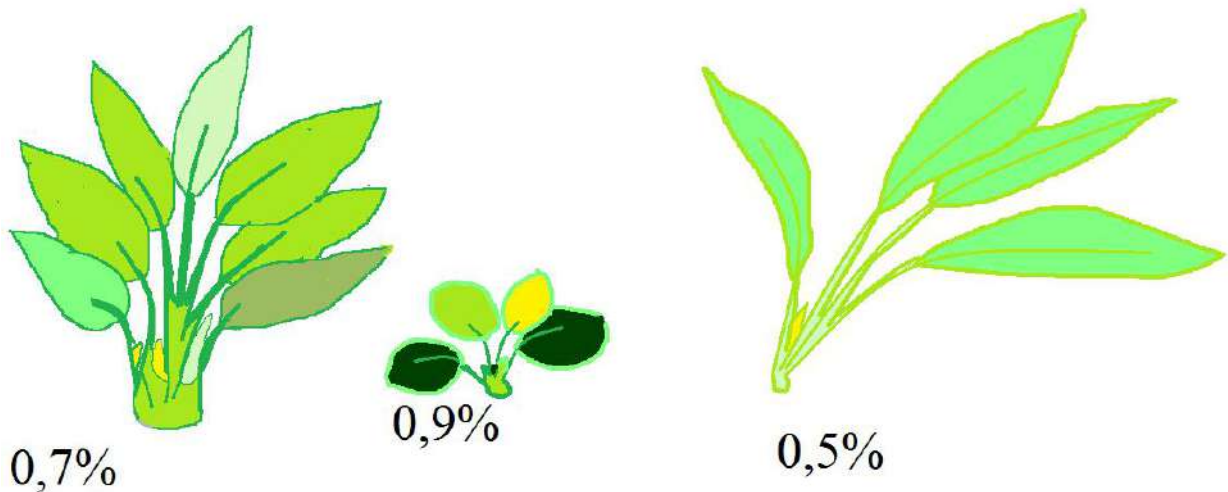


Рисунок 4.14 – Генезис листків хости залежно від консистенції агаризованого середовища, де 0,7%, 0,9%, 0,5% - концентрації агар-агару

Окрім концентрації елементів мінерального живлення, гормонів, активованого вугілля під час культивування хости виявлений вплив на ріст рослин *in vitro* концентрації вуглеводів (сахарози). Отримання регенерантів на середовищах без сахарози та з додаванням її від 10 до 60 г/л виявлено наступне (рис. 4.15): за автотрофного живлення регенеруються рослини з 2-3 листками і великими темно-зеленими листковими пластинками. За нашими спостереженнями, такі листки регенеранти сформували під час живцювання

від вихідних материнських рослин, а розростання їх обумовлене автотрофним способом живлення.

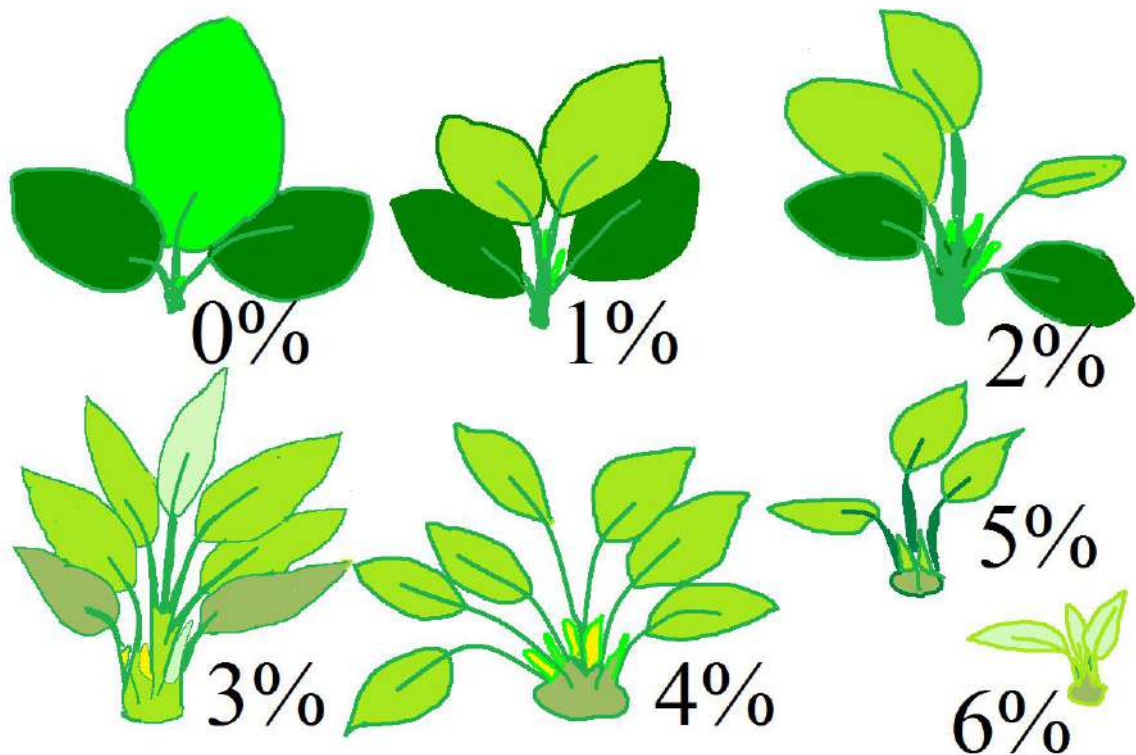


Рисунок 4.15 – Вплив концентрації сахарози в живильному середовищі на морфогенез регенерантів хости

Із збільшенням концентрації сахарози, як джерела гетеротрофного живлення, розміри листкових пластинок зменшувались. Найсильніше це проявлялось за концентрацій більше 4%.

Максимальна кількість листків (від 4 до 7 шт. на рослині) відмічена за вмісту сахарози від 2 до 4%. Більша кількість пагонів була на середовищах із 3 і 4% сахарози. Збільшення вмісту вуглеводу зменшувало розміри, кількість листків та число пагонів.

***Вплив введення регенерантів в стан спокою на фоліогенез.***

Встановлено вплив на генезис листків та морфогенез пагона введення вихідних для живцювання рослин (маточних рослин) в стан спокою (рис. 4.16). За таких умов відмічалось потовщення пагона в прикореневій зоні з



одночасним всиханням листків. Вважаємо, це пов'язано із відтоком пластичних речовин із листкових пластинок до денця, пазушних бруньок.

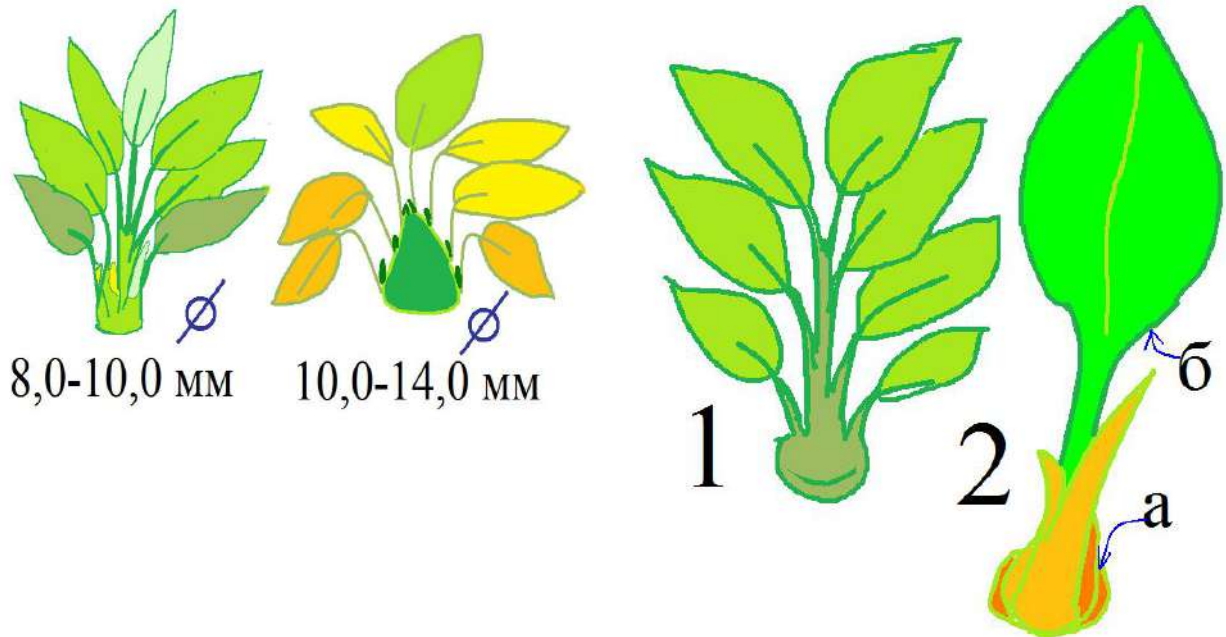


Рисунок 4.16 – Зміна прикореневої зони пагона хости за введення регенерантів в стан спокою

Рисунок 4.17 – Особливості росту регенерантів хости залежно від введення маточних рослин в стан спокою: 1. не вводились у стан спокою, 2. вводились у стан спокою (а – лускоподібні листки, б – типові листки).

Після пробудження експлантів (ізолюваних пагонів) рослин, що знаходились у стані спокою, розвиток листків був типовим для нативних умов (рис. 4.17). Тобто, після пробудження розпочинались перші етапи органогенезу властиві *in vivo*. Спочатку з'являлись верхівки листків які *in vivo* виконують функції “пробивних листків”, бо вони розсовують ґрунт, надаючи можливість більш ніжнім листкам досягнути світла. У пробивних листків в пробіркових і в нативних умовах майже не розвивається листкова пластинка, вони залишаються лускоподібними й короткими, тобто виконують ту саму функцію, що й луски бруньок в дерев. Головна роль їх – захист більш ніжних органів (наприклад, меристеми). Ці листки в хости називають катафілами, або листками низової формації, тому, що вони розміщені нижче решти листків на пагоні. Потім утворюються типові листки

з листковою пластинкою. Інтенсивний розвитку верхнього листка пояснюється їх призначенням забезпечення рослини продуктами фотосинтезу.

Вважаємо, що такі відмінності регенерантів пов'язані з різним гормональним статусом вихідних рослин-донорів експлантів залежно від того були вони, чи ні в стані спокою.

#### **Висновки до розділу 4**

При переході рослинних об'єктів на етапах *in vivo* – *in vitro* – *ex vitro* – *in vivo* за наявності індукуючих умов відбуваються процеси ювенілізації та реювенілізації. Це залежить від способів живлення (міксотрофне, гетеротрофне чи мікотрофне) та компонентів живильного середовища. Морфологічно це проявляється у зміні форм фотосинтезуючих органах.

1. У туї відмічені голкоподібна (ювенільні) та лускоподібна хвоя. За постасептичної адаптації вся вона ставала лускоподібною. Генезис листка у картоплі, гвоздики залежав від трофічної регуляції та онтогенетичного віку організму. Домінуючу роль у прояві форми листка *in vitro* також відіграло походження експлантів: від насінини чи бруньки. Доведено, що в умовах *in vitro* можна тривалий час зберігати ювенільність картоплі. Виявлений вплив концентрації сахарози на величину площі листків, висоти пагона сортів Подолянка та Слов'янка, зокрема в процесі субкультивування. Аналогічне стосувалось процесу ризогенезу.

2. Доведений вплив аерації та способів живлення на формування листків у картоплі. Особливо велика роль в утворенні запасуючих органів відводиться концентрації сахарози, хоча вона по-різному впливала на кількість і масу бульб, у тому числі з урахуванням біологічних особливостей сортів. Загущене вирощування сортів троянд спричиняло утворення не ювенільних простих листків, а складних, розсічених. Аналогічне відмічалось за загущеного вирощування регенерантів смородини.

3. За культивування *in vitro* хости відмічений вплив концентрації елементів живлення, наявність ІМК та активованого вугілля, консистенції середовища на форму, величину листків. Зниження концентрації мінеральних елементів середовища Мурасіге і Скуга вдвічі спричиняло зменшення кількості листків, вкорочення та округлення листкової пластинки, зменшення довжини та товщини черешка. Додавання в середовище ІМК (4 мг/л) обумовлювало подовження черешка. Використання активованого вугілля обумовило вкорочення листкової пластинки, але розміри листків збільшувались. Зниження рівня живлення також призводило до строкатості листків, а додавання ауксину дещо нівелювало це явище. Достатнє автотрофне живлення (концентрація сахарози 2-4 %) регенерантів хости позитивно впливало на кількість листків, пагонів. Збільшення її концентрації до 5- 6 % негативно відбивалось на розвитку рослин.

4. Виявлено, що введення вихідних для живцювання рослин у стан спокою спричиняло потовщення пагона в прикорневій зоні, всихання листків. Після пробудження розвиток листків був типовим для нативних умов.

За матеріалами досліджень розділу 4 опубліковано 19 наукових праць [103, 110, 111, 112, 113, 122, 124, 127, 128, 133, 136, 139, 142, 155, 182, 185, 186, 216, 235].



## РОЗДІЛ 5

### РІЗНОЯКІСНІСТЬ РОСЛИН *IN VITRO*

#### 5.1. Онтогенетична різноякісність

Рослинний організм складна система із клітин, тканин, органів. Різні його частини є фізіологічно не однаковими. Прикладом можуть бути різні параметри регенерації рослин *in vitro* павловнії з неоднаковим походженням живців експлантів (рис. 5.1). Регенеранти з верхівкових живців мали більші розміри і в них швидше розпочинався ризогенез. Навіть, в межах одного вузла можуть утворюватись мікропагони з різною кількістю листків: одні з парою листків інші з трьома (рис. 5.2).



Рисунок 5.1 – Особливості регенерації рослин павловнії з живців різного походження, де 1 – регенеранти із верхівок, 2 – регенеранти із живців ізольованих з медіальної частини пагона.

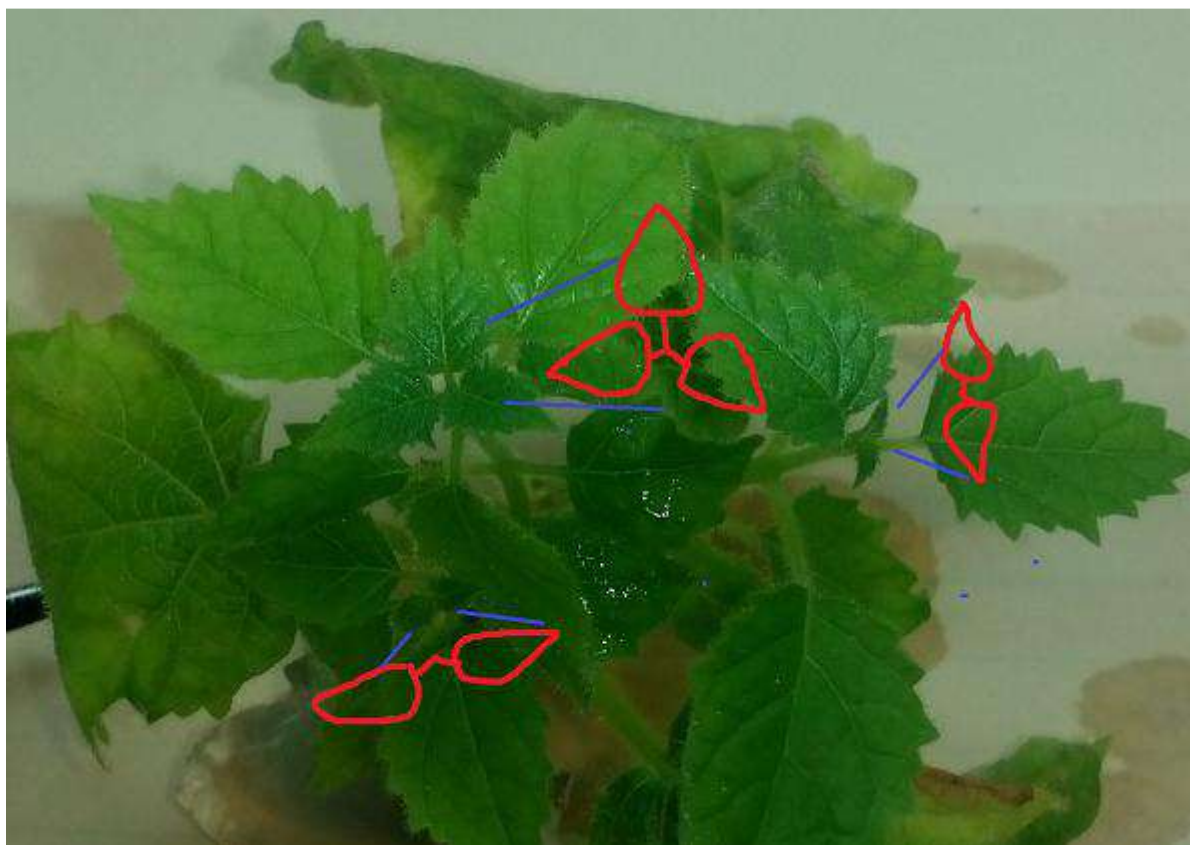


Рисунок 5.2 – Відмінність пагонів павлонії *in vitro* в межах одного вузла

Під час клонування рослин *in vitro* залежно від розміщення живців на материнській рослині виявлено відмінності в розвитку регенерантів в межах одного і того ж сорту. Для дослідження впливу походження на процес вегетування *in vitro* вирощували регенеранти картоплі з експлантів (живців) ізольованих з трьох зон материнської рослини *in vitro*: I – верхівка рослини, II – середина зона стебла, III – базальна зона стебла (рис. 5.3) впродовж 10 субкультивувань (пасажів) методом накладання.



Рисунок 5.3 – Відмінності в розвитку регенерантів картоплі залежно від походження живців (друге субкультивування), сорт Слов'янка

I A – живець з верхівки рослини, I B – регенерант з верхівкового живця (I A),  
 II A – живець з середньої зони стебла, II B – регенерант з живця II A,  
 III A – живець з базальної зони стебла, III B – регенерант з живця III A.

Встановили таку залежність: регенеранти з базальної частини стебла відставали в рості і розвитку, порівняно з іншими варіантами. З кожним наступним пасажом регенерація рослин з живців вповільнювалась, а на 8 – 10 пасаж у таких регенерантів майже відсутня коренева система, стебло коротке з 4-5 міжвузлями. Рослини регенеровані з живців середньої зони стебла впродовж 10 субкультивувань стабільно розвивались, формували однотипні міцні стебла з добре розвиненими листками та кореневою системою.

Серед досліджуваних варіантів найкращі темпи росту і розвитку спостерігали в регенерантів з верхівки стебла до 4 – 5 живцювання. Зокрема, вони мали найвищі стебла, найбільшу масу кореневої системи. Проте, в



процесі наступних регенерацій (після 4 – 5 пасажу) ріст і розвиток рослин вповільнювався і вони за біометричними показниками ставали близькі до регенерантів із медіальної зони стебла [110, 121].

Подібна тенденція простежувалась і за вирощування розсади з рослин *in vitro* в умовах теплиці (рис. 5.4). Регенеранти, отримані з різних живців, мали неоднакові адаптаційні властивості, зокрема особливості походження вихідних живців позначались на приживленні розсади.



I - регенерант з верхівки стебла, II - регенерант з серединної частини стебла, III – регенерант з базальної частини стебла

Рисунок 5.4 – Розвиток регенерантів картоплі в закритому ґрунті залежно від походження живців

Рослини з верхівкових живців, порівняно з іншими варіантами, характеризувались здатністю до утворення великої листкостеблової маси, а також більш розвиненої коревої системи. Вказане відіграє важливу роль у формуванні потенціалу майбутнього врожаю. Порівняльний аналіз продуктивності розсади *ex vitro* засвідчив, що рослини з верхівкових живців утворюють, як правило, пізніше і дещо меншу кількість бульб, однак середня маса їх істотно вища, ніж у рослин з нижніх живців. Ці регенеранти, порівняно з іншими варіантами в межах сорту, мали на 7-8 діб довший період вегетації. У них детермінована менша фотосинтетична поверхня і коротший термін її функціонування. Регенеранти з базальної частини стебла, маючи невеликі розміри листків, стебел та кореневої системи, швидше починають і завершують формування стolonів та бульб. Це обумовлює їх короткий період вегетації, що і спричиняє нижчу урожайність [109, 121].

Встановлена залежність підтверджена і на інших культурах: хризантемі, гвоздиці. Доведено, що за першого живцювання на 30 добу розвитку рослини, регенеровані із живців взятих з базальної частини пагона, були найменшими у висоту, яка становила у хризантеми 79, а гвоздики – 66 мм (рис. 5.5, 5.6). При цьому, висота рослин з верхівок живців хризантеми становила 189 мм, а гвоздики – 117 мм, із середини пагона, відповідно, 136 і 78 мм.

За наступних живцювань методом накладання встановлено, що рослини з базальних живців впродовж усіх субкультивувань зберігали найнижчу регенераційну здатність. На 10-те живцювання їх висота становила у хризантеми 48 мм, а гвоздики – 43 мм. У рослин від медіальних живців висота істотно не змінювалась, порівняно з першими живцюваннями. Регенеранти з верхівок за співставлення з першим живцюванням відрізнялись істотним зниженням висоти: у гвоздики вже після четвертого живцювання з 117 до 66 мм, а в хризантеми після шостого живцювання з 189 до 79 мм.



Рисунок 5.5 – Ріст і розвиток регенерантів хризантеми під час МКР залежно від походження живців

1. Регенеранти з живців ізольованих з апікальної частини пагона
2. Регенеранти з живців ізольованих з середньої частини пагона
- 3 Регенеранти з живців ізольованих з базальної частини пагона

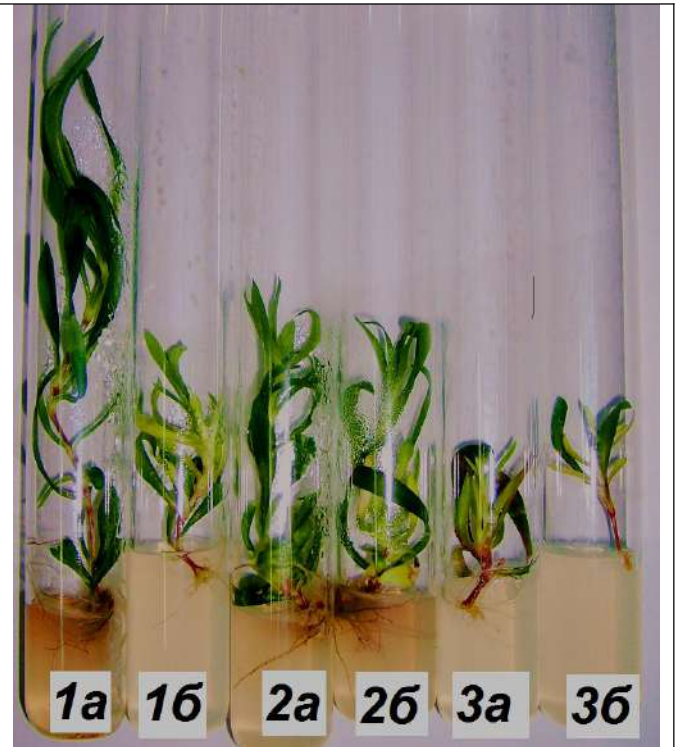


Рисунок 5.6 – Ріст і розвиток регенерантів гвоздики в процесі МКР залежно від походження живців

1. Регенеранти з живців ізольованих з апікальної частини пагона
  2. Регенеранти з живців ізольованих з середньої частини пагона
  3. Регенеранти з живців ізольованих з базальної частини пагона
- а- перше живцювання,  
б - п'яте живцювання.

Походження живців впливало на розвиток як пагона так і кореневої системи. Інтенсивність регенерації пагона була подібною до розвитку кореневої системи. У регенерантів з базальних живців поряд з незначною висотою пагона відмічено слабо розвинену кореневу систему. Причиною цього, на нашу думку, може бути недостатня кількість ауксинів, які синтезувались у верхівках невеликих за розміром пагонів, і повільно,

пересувались вниз. Саме їх нестача зумовлювала слабкий розвиток кореневої системи. Припускаємо, що слаборозвинена коренева система в свою чергу синтезувала, порівняно з іншими варіантами, меншу кількість цитокінінів, які в недостатній кількості надходили до апікальних живців й накопичувались переважно в базальній частині регенерантів. Такий взаємний вплив між частинами пагона відповідає загально визнаному положенню про корелятивний зв'язок між надземною і підземною частинами рослини [27, 164].

У регенерантів з апікальних живців за перших субкультивувань спостерігався активний розвиток кореневої системи і пагона. Але, з часом, наступало вповільнення темпів їх регенерації. Причиною цього може бути зсув цитокінін-ауксинового індексу на користь ауксинів (нестача цитокінінів). Згідно з правилом Скуга-Міллера за нестачі цитокінінів гальмується розвиток меристем та бічних бруньок [27], а отже, вповільнюється прямий морфогенез під час регенерації.

Окрім картоплі, хризантеми, гвоздики встановлені залежності підтверджені дослідженнями з двома представниками родів родини *Cactaceae* (табл. 5.1, рис. 5.5). На розвиток експлантів також впливало їх походження. Так, за 8 годинного фотоперіоду експлантам з апікальної бруньки властивий прямий морфогенез, тоді як у експлантів з базальної частини стебла відмічене калусоутворення в 67 % *Sclerocactus spinosior ssp. Blainei* "schleseri" та 21 % *Astrophytum myriostigma v. Monstroza cv. "Lotus Land"*, а також вповільнена регенерація.

Вважається, що основною причиною асинхронного розвитку регенерантів є порушення в розміщенні ендогенних гормонів у межах материнської рослини. Ця асинхронність є однією з проблем, яку необхідно усунути для успішного промислового МКР цих та інших видів рослин. Такі відмінності в регенераційному потенціалі різних за походженням живців пояснюються тим, що ріст і розвиток тканин, окремих органів і частин рослини перебувають у взаємно обумовлених зв'язках. Кореляції є

взаємовпливом за участі гормонів одних частин рослин на інші, які нерідко досить віддалені [27].

Таблиця 5.1 – Вплив різних за розміщенням на материнській рослині експлантів на розвиток регенерантів (1 мг/л БАП та 1 мг/л ІМК)

Походження експлантів	Калюсогенез, %	Морфогенез, %	
		повільний*	швидкий
<i>Astrophytum myriostigma</i> v. <i>Monstrosa</i> cv. "Lotus Land"			
апикальні	1	26	73
медіальні	6	38	54
базальні	21	42	37
НІР <sub>05</sub>	2	4	3
<i>Sclerocactus spinosior</i> ssp. <i>Blainei</i> "schleseri"			
апикальні	4	-	96
медіальні	14	9	77
базальні	67	31	2
НІР <sub>05</sub>	4	-	3

Примітка: \*повільний морфогенез – тривалість формування бруньок понад одного місяця

Отже, за МКР картоплі, гвоздики, хризантеми, склерокактусів, астрофітумів та хости виявлені зв'язки між частинами вихідної рослини і окремими органами культур, що зумовило неоднакові регенераційні властивості в процесі мультиплікації їх *in vitro*.

Фітогормональний статус пагона та кореня є основним фактором корелятивних взаємозв'язків (рис. 5.8). Верхівка пагона забезпечує синтез і базипетальний відтік ауксинів, які індукують загальну генетичну програму коренеутворення, тоді як верхівка кореня продукує цитокініни, які



рухаючись акропетально після надходження в надземну частину рослини ініціюють програму утворення, росту та активності листків [164].



Рисунок 5.7 – Вплив різних за походженням на материнській рослині експлантів на розвиток регенерантів (зліва з базального живця, праворуч морфогенез з апікального)

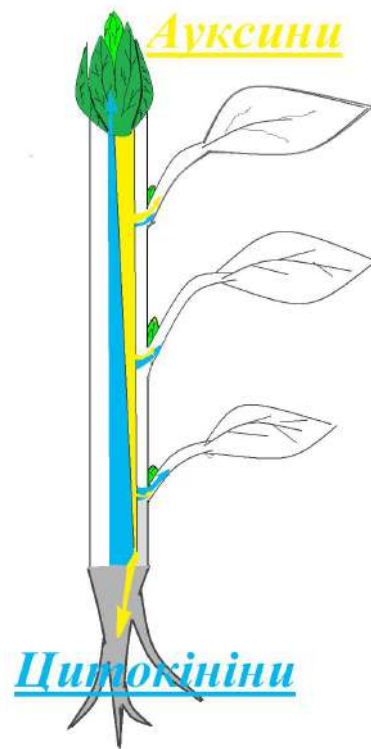


Рисунок 5.8 – Схема розподілу ауксинів та цитокінінів у бруньках вихідної для живцювання рослини

Так, пагін впливає на корінь через постачання йому ауксинів, а корінь забезпечує свій вплив на пагін індукуючи цитокініни. За втрати рослиною частини органів спостерігається підсилення або уповільнення їх функцій внаслідок порушення стимуляційних або інгібіторних кореляцій [47].

Наприклад, з ростом верхівкової бруньки гальмується ріст і розпускання бруньок розташованих нижче неї. Таке явище пов'язано з тим, що ауксин синтезується у верхівковій бруньці і пересувається у бокові за наявності надлишкової кількості. Після видалення верхівкової бруньки ауксин починає синтезуватись в бокових бруньках у оптимальній кількості, вони розпускаються і ростуть [27].

Припускаємо, що після поділу пагона вихідної донорної рослини, в якій ауксини і цитокініни нерівномірно розподіляються, а тому отримані живці мають різні гормональні статуси. Звідси верхівка має багато ауксинів і мало цитокінінів, а живець з базальної частини навпаки містить в надлишку цитокініни. Викладене підтвердилось результатами досліду (табл. 5.2).

Таблиця 5.2 – Розвиток регенерантів хости на 30 добу культивування залежно від походження експлантів та концентрації БАП (сорт Гіацінтіна)

Тип живців	БАП, мг/л	Висота рослин, мм		Довжина кореневої системи, мм		Коефіцієнт розмноження		Вітріфікованих, %	
		Кількість субкультивувань							
		1	10	1	10	1	10	1	10
апикальні	1	74±5	56±4	61±4	24±5	4,8±0,4	2,3±0,4	0	2,0±0,6
	2,5	63±4	41±5	58±7	7±3	2,2±0,2	1,4±0,3	0,3±0,2	15±2
медіальні	1	51±4	53±3	36±4	33±5	4,6±0,5	4,5±0,4	3,0±0,3	2,8±0,4
	2,5	44±5	31±6	21±3	3,0±0,5	4,9±0,6	1,1±0,4	5,0±0,7	39±7
базальні	1	37±3	18±4	11±2	0	1,4±0,3	0,8±0,4	2,0±0,5	78±6
	2,5	23±4	12±3	0,4±0,2	0	0,9±0,4	0,3±0,2	11±3	93±7

Проводили МКР хости (сорт Гіацінтіна) методом накладання. Культивували *in vitro* три типи регенерантів із сегментів денця (живців) з апікальними, медіальними та базальними бруньками (рис. 5.9) на двох варіантах живильного середовища, що відрізнялись за кількістю екзогенних цитокінінів (БАП в концентраціях 1,0 і 2,5 мг/л).

Встановили, що за нижчих концентрацій екзогенної речовини з цитокініновою активністю пригнічення регенерації після 10 послідовних субкультивувань відбувалось значною мірою у регенерантів базального походження (рис. 5.10). Їх висота зменшилась з 23 до 12 мм за відсутності утворення коренів. Відсоток рослин з ознаками вітріфікації сягав 78. Тобто, проявлявся ефект подібний до фітотоксичного впливу надлишкових

концентрацій речовин з фізіологічною активністю. Менш вираженим було пригнічення живців апікального походження. Майже без змін відбувався розвиток регенерантів з медіальних живців за невисоких концентрацій БАП.

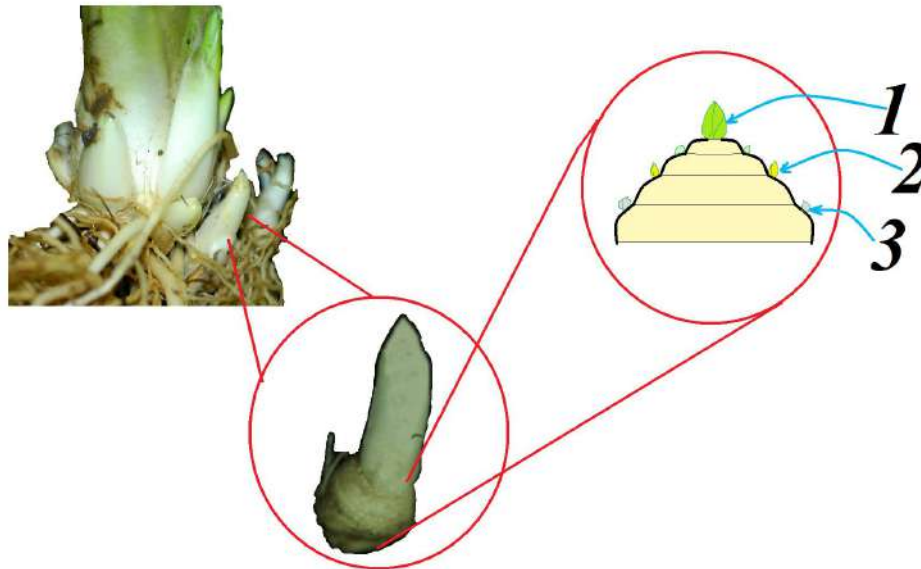


Рисунок 5.9 – Типи експлантів хости із сегментів денця (живців) з апікальними (1), медіальними (2) та базальними (3) бруньками

Вирощування регенерантів на середовищах із збільшеною концентрацією БАП до 2,5 мг/л на 10-е субкультивування обумовлювало хоч і в неоднаковій мірі пригнічення розвитку регенерантів. Особливо це стосувалось розвитку рослин, регенерованих з базальних живців. За таких умов кількість вітрифікованих рослин становила 93%. Лише 30% з них можна було живцювати. Решта рослин цього варіанту виявились непридатними для мультиплікації. Тобто, можна припустити, що в регенерантів значно зріс цитокініновий статус, аж до різкого прояву фітотоксичної дії.

Ще одним доказом накопичення та передавання посиленого цитокінінового статусу були дослідження, в яких вихідні для живцювання рослини вирощували на середовищах з високим вмістом цитокінінів. Це своєрідна детермінація розвитку регенерантів індукцією (підготовкою) материнської рослини. Тобто, гормони застосовували не під час отримання

регенерантів з живців, а індукуванням у вихідних для живцювання рослин. За контроль слугували рослини донори експлантів, які були вирощені на середовищі без додавання гормонів. Розвиток регенерантів з експлантів ізольованих з індукованих вихідних рослин на середовищі без цитокінінів був подібним до регенерантів, які росли на середовищі з цитокінінами, але були ізольовані з контрольних рослин [27, 116].

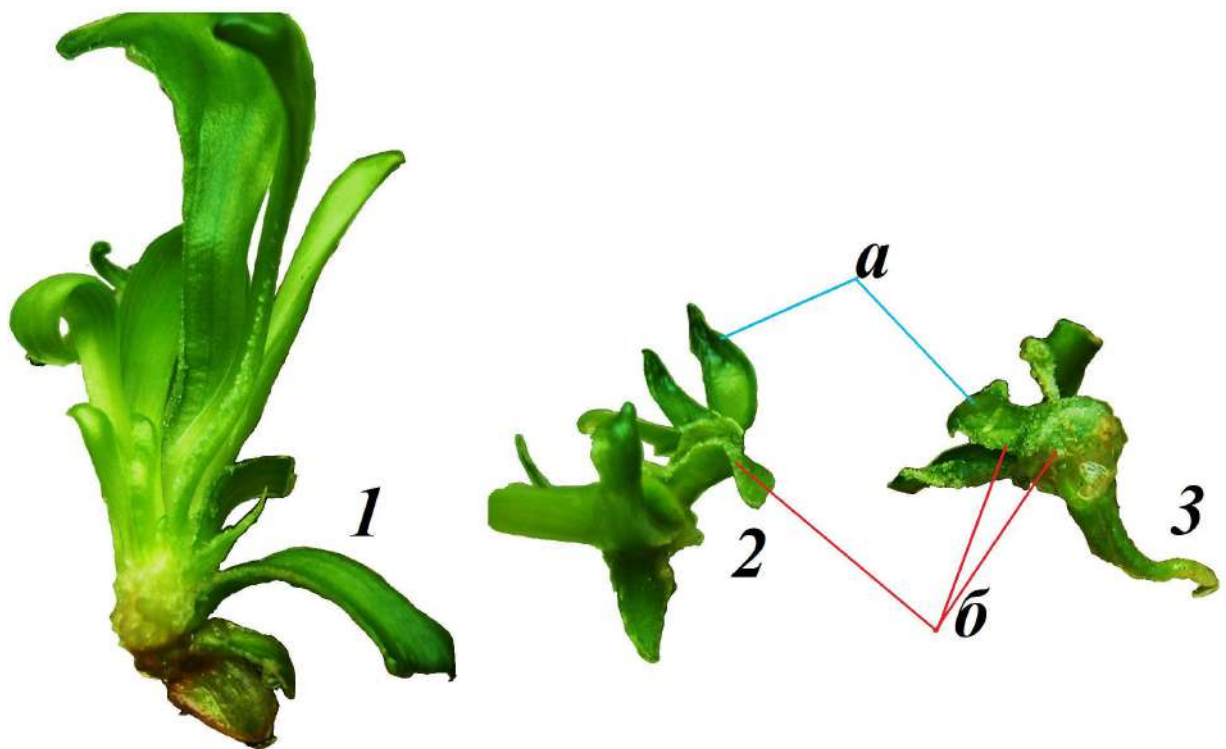


Рисунок 5.10 – Фітотоксичний прояв високої концентрації БАП (5 мг/л) в штучному живильному середовищі, хоста, сорт Гіацинтіна: 1 – медіальні живці 10 пасаж , 1 мг/л БАП; 2 – медіальні живці 10 пасаж , 2,5 мг/л БАП; 3- базальні живці 10 пасаж , 1 мг/л БАП; а – вітрифікація; б – калусоутворення.

Таким чином відбувається прояв надлишкової дії речовин з цитокініноювою активністю в регенерантах базального походження за живцювання методом накладання. Посилює цей процес додавання в живильне середовище високих концентрацій екзогенних синтетичних цитокінінів.

Стосовно різноякісності живців (експлантів) розміщених у різних ярусах рослини існують дослідження О. П. Таран (1998), які підтверджують наші дані щодо різного вмісту гормонів в донорних рослинах [218]. Фітогормональний статус живців неоднаковий через відмінності за вмістом ауксинів і гіберелінів, оскільки саме ці групи фітогормонів стимулюють ріст стебла [344]. Встановлено чіткий градієнт вільної ІОК, пов'язаний із зональним розподілом. Найвищий вміст цього фітогормону та гібереліну виявили в апікальній зоні стебла та найменший в базальній. Тобто, базальні живці містили найменшу кількість вказаних гормонів [219].

Зниження вмісту фітогормонів у базальній частині рослини можливо пов'язано із процесом старіння. Відомо, що для молодих листків характерний високий вміст ауксинів, який знижується після призупинення росту, а старіння листків супроводжується зниженням вмісту гіберелінів [268].

Отже, асинхронність розвитку регенерантів значною мірою пов'язана з різним гормональним статусом експлантів, ізольованих з різних частин паногона рослини-донора.

## **5.2. Вплив способів живцювання та кількості субкультивувань на регенерацію рослин хости з експлантів**

Клональне мікророзмноження хости відбувається прямим морфогенезом – активацією пазушних бруньок. Найбільш простим способом є розділення куща на окремі пагони з двома-трьома листками (рис. 5.11). Але для утворення такої маточної рослини необхідно тривалий час – два-три місяці.

Причиною цього є апікальне домінування верхівкової бруньки, що уповільнює розвиток бічних. Ще одним недоліком методу є те, що для отриманого матеріалу не властивий синхронний розвиток. Асинхронність ускладнює як МКР, так і постасептичне дорощування. Це, як і в інших культур, пов'язано з онтогенетичною різноякісністю живців (бруньок) та корелятивними зв'язками [27, 85, 122].



Рисунок 5.11 – Кущ *in vitro* хости перед поділом (контроль)

Також складним є поділ куща, оскільки часто пошкоджуються точки росту. Тобто, утворене черешками листків несправжнє стебло та точка росту відрізається від стебла-денця. Тому, випробувано два прийоми зняття апікального домінування: вкорочення листків, які вкривають стебло, та розрізання денця (рис. 5.12). У контролі (табл. 5.3) залежно від сорту період між субкультивуваннями становив від 120 діб (Паульс глорі) до 79 діб (Патріот). Вкорочення листків у сортів Паульс глорі та Патріот зменшувало період між субкультивуваннями до 103 та 81 добу, відповідно.

У варіанті, що передбачав поділ денця період між субкультивуваннями скоротився в рази. Так, у сорту Паульс глорі з 120 до 23 діб, Гіацінтіана – 79 до 20 діб. Кількість живців (коефіцієнт розмноження) також була більшою у цьому варіанті. Тобто, кожне наступне субкультивування можна проводити через 20-23 діб.

Розмноження таким способом потребує менших культуральних ємностей та затрат електроенергії на отримання експлантів. Хоча, як показує наш практичний досвід, що отримані таким методом рослини перед висадкою в теплицю потребують культивування впродовж 20-45 діб на середовищах для укорінення.



Зростання кількості одержаних живців та скорочення періоду між субкультивуваннями (пасажами) дозволило збільшити вихід дочірніх рослин з вихідної. Наприклад, у сорту Паульс Глорі, за результатами теоретичних розрахунків де 4,7 коефіцієнт розмноження, а 10 кількість пасажів отримаємо  $4,7^{10}$ .

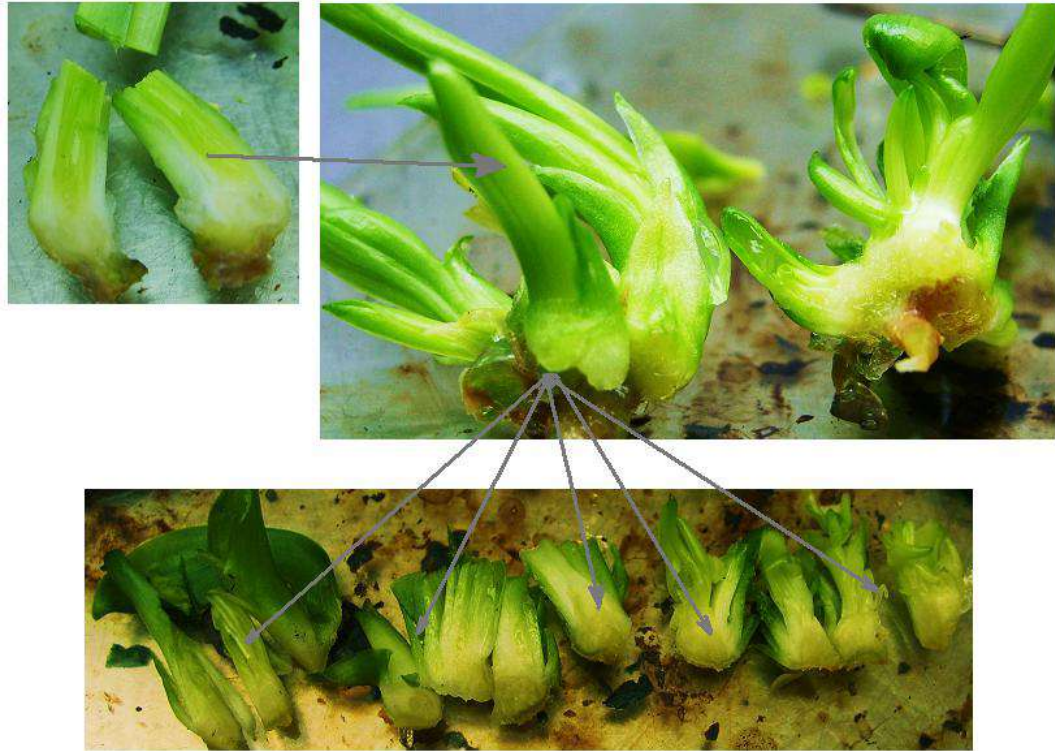


Рисунок 5.12 – Зняття апікального домінування поділом денця, сорт Гіацінтіна

На період між субкультивуваннями незалежно від пасажу впливали й біологічні особливості сортів. Зокрема, серед досліджуваних найкоротші вони відмічені за 8 пасажу у сортах Патріот 20 діб та сорту Гіацінтіана – 21 діб, а найдовший у сорту Халціон – 29 діб (табл. 5.4).

Під час введення нових сортів в асептичну культуру спостерігались зміни в періоді між послідовними живцюваннями. Не виявлено істотної різниці між шостим і восьмим пасажем у сортів Паульс глорі, Хальціон та Гіацінтана, а в сорту Патріот між п'ятим та восьмим субкультивуванням.

Таблиця 5.3 – Вплив способів зняття апікального домінування на МКР хости

Варіант	Сорт					
	Гіацінтіана		Паульс Глорі		Патріот	
	Період культивування, діб	Коефіцієнт розмноження	Період культивування, діб	Коефіцієнт розмноження	Період культивування, діб	Коефіцієнт розмноження
Контроль	120	4,2	97	4,9	79	4,3
Вкорочення листків	103	4,0	84	4,4	81	4,2
Поділ денця	23	4,7	21	4,9	20	5,1
НІР <sub>05</sub>	8	0,2	5	0,3	6	0,2

Таблиця 5.4 – Вплив кількості асептичних субкультивувань на період живцювання поділом денця, діб

Кількість субкультивувань, шт.	Сорти			
	Паульс глорі	Патріот	Халціон	Гіацінтана
1	51	40	67	48
2	43	38	61	34
3	40	37	58	28
4	33	32	52	27
5	27	21	37	25
6	23	22	31	21
7	23	21	28	20
8	24	20	29	21
НІР <sub>05</sub>	2	3	4	3

Також візуально рослинам, що впродовж тривалих пасажів адаптувалися до умов *in vitro*, властива вирівняність (синхронність) росту. Вважаємо, що це обумовлено стабілізацією обміну речовин рослинного організму до умов *in vitro*, в т.ч. екзогенні гормони, міксотрофне живлення.



Отже, можна відмітити наступну залежність за субкультивувань сортів хости: живцювання вихідних рослин поділом денця дозволяє скоротити періоди між субкультивуваннями та збільшити вихід регенерантів впродовж року, як мінімум у сорту Паульс Глорі з 74 шт. до  $4,7^{10}$  і більше. Під час перших послідовних 4-6 субкультивувань відбувалось скорочення періоду вирощування залежно від сорту з 51-67 до 20-29 діб. В наступних субкультивуваннях цей показник не змінювався.

### 5.3. Вплив віку материнських рослин-донорів експлантів на розвиток регенерантів туї західної

Дослідження виконані за послідовних субкультивувань методом накладання донорів живців віком 20 і 60 діб (рис. 5.13). Уже після третього субкультивування регенерантів від експлантів ізолюваних з 20 добових



Регенеранти з експлантів ізолюваних з донорів віком 20 діб



Регенеранти з експлантів ізолюваних з донорів віком 60 діб

Рисунок 5.13. – Вплив віку материнських рослин-донорів експлантів на розвиток ренегенерантів туї західної

донорів виявлені ознаки гіпергідратації тканин та іони втрачали здатність до ризогенезу і мали вкорочений пагін, а за п'ятого субкультивування морфогенез був відсутній і лише деякі експланти утворювали твердий не морфогенний калюс.

В той же час експланти з 60 добових донорів утворювали рослини-регенеранти з кореневою системою. У них були добре сформовані пазушні бруньки, з яких після живцювання регенерувались повноцінні пагони.

Ризогенез регенерантів з 60 добових рослин-донорів свідчить про те, що в материнських рослинах змінилось з віком співвідношення гормонів, тобто змінився цитокінін-ауксиновий індекс в сторону ауксинів.

Використання рослин донорів експлантів віком 90 діб обумовлювали утворення слаборозвинутих регенерантів, у яких формувалась лускоподібна хвоя та в базальній частині пагона виділялись фенолоподібні речовини.

#### 5.4. Різноманітність розсади агпантусу *in vitro* залежно від періоду її культивування

За різних періодів субкультивування *in vitro* встановлено вплив віку рослин донорів експлантів на ефективність регенерації із них рослин-регенерантів (рис. 5.14). Використання донорами експлантів віком 30 і 45 діб обумовлювало низьку приживлюваність у закритому ґрунті – в межах 27-58% (табл. 5.5). У сорту Charlotte за посадки регенерантів в закритий ґрунт прижилось 27 %, а у випадку 90 добових рослин – 98 %. У сорту Black magic це, відповідно, становило 31 і 100%.

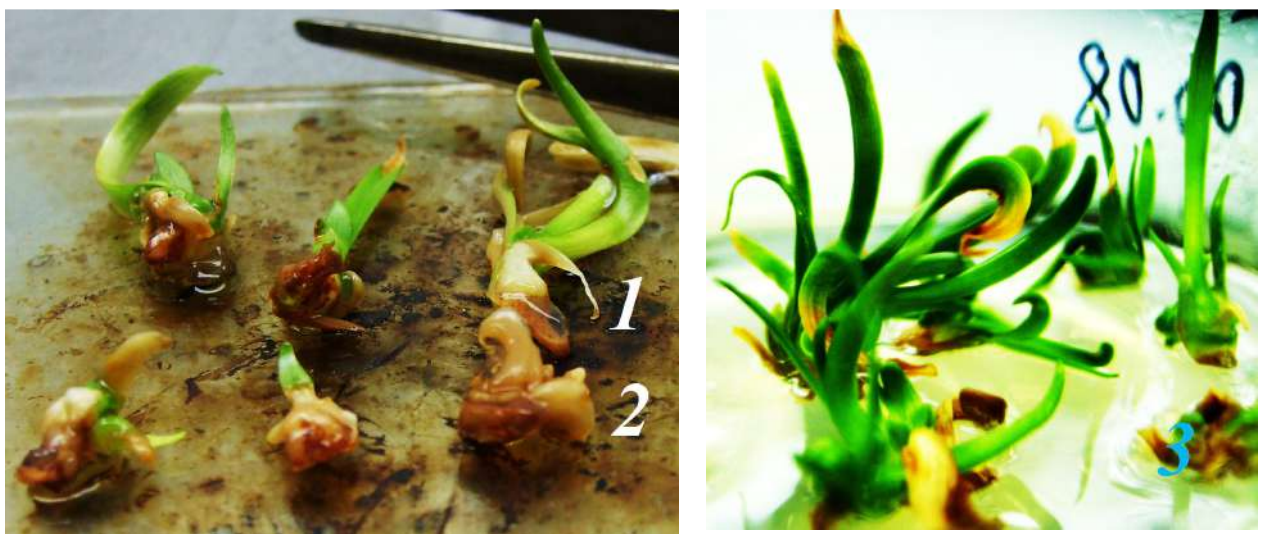


Рисунок 5.14 – Вплив віку вихідних рослин на приживання ізольованих мікропагонів агпантусу *in vitro*, де: 1 – 30 діб 2 – 45 діб 3 – 90 діб.

За висотою пагона регенеранти цих варіантів різко відрізнялись від рослин, одержаних з експлантів, ізолюваних від 90 добових донорів. Так, у сорту Charlotte висота пагонів з донорів віком 90 діб становила 82 мм. Для порівняння, в регенерантів із віком 30 і 45 діб це, відповідно, становило 16 і 18 мм. Висота в рослин, що культивувались 90 діб *in vitro* була в сорту Black magic 107 мм, що на 80 мм більше, ніж у рослин які вирости з 30 добових регенерантів.

Таблиця 5.5 – Вплив віку рослин-донорів експлантів на приживання та морфогенез у регенерантів агпантусу

Вік рослин-донорів, діб	Прижилось експлантів, %	Висота пагона, мм	Кількість пагонів в кущі, шт.
Сорт Charlotte			
30	27	16	1,1
45	45	18	1,3
90	98	82	3,2
Сорт Black magic			
30	31	27	1,2
45	58	63	1,3
90	100	107	3,6

Також рослини відрізнялись за кількістю пагонів в кущі. Зокрема у вирощених з 45 добової розсади в сорту Charlotte їх було 1,1 шт. та 1,2 пагона в сорту Black magic. Водночас, від 90 добової розсади формувались кущі з 3,2-3,6 пагонами, залежно від сорту. Це дозволило окрім кращої адаптації отримати продукцію з привабливішими товарними якостями, а за потреби додаткового постасептичного розмноження й більший його коефіцієнт.

## Висновки до розділу 5

Різноманітність регенерантів, вирощених за однакових умов *in vitro*, включаючи елементи живлення може мати такі причини: використання експлантів (живців) ізольованих з різних ділянок вихідних рослин донорів; різний вік рослин донорів експлантів; неоднакова кількість субкультивувань донорів експлантів у асептичних умовах.

1. Виявлена онтогенетична різноманітність живців павловнії. Регенеранти верхівкових живців мали більші розміри, у них швидше розпочинався ризогенез. Відмічена різнолистковість, навіть, у межах одного вузла. Аналогічне стосувалось картоплі, хризантеми, гвоздики, кактусів, що пояснюється порушенням кореляційних зв'язків між частинами вихідної рослини в процесі мультиплікації *in vitro*.

2. Різноманітність експлантів астрофітуму на материнській рослині: апікальні, медіальні та базальні обумовили мінімальну частку регенерантів, які утворювали калюс, серед апікальних живців (порівняно з базальними у 21 раз), більш швидкий морфогенез (у 1,6 рази).

3. Висота рослин хости на 30 добу культивування з апікальних живців, за вмісту в середовищі БАП 1 мг/л, і медіальних різнилась у 1,5 рази на користь перших, а з базальними це становило 2,0 рази. За десятого субкультивування співвідношення, відповідно, сягало 1,1 і 3,1 рази, тобто із зростанням числа пересадок рослин різниця між апікальними та медіальними живцями майже нівелювалась. За збільшення концентрації БАП до 2,5 мг/л під час першого культивування співвідношення виявились близькими до згаданих, проте за десятого різниця у висоті рослин від апікальних та базальних живців становила 3,4 рази.

4. Встановлено, що для зняття апікального домінування в хости оптимальним способом виявилось поділ денця. Це дозволило, порівняно з контролем, скоротити період культивування в трьох сортів у межах від 79-120 діб до 20-23-х і збільшити коефіцієнт розмноження з 4,2-4,9 до 4,7-5,1. Період живцювання із зростанням субкультивувань зменшувався, проте в

сорту Патріон він стабілізувався, починаючи з п'ятого, а в сортів Паульс глорі, Халціон та Гіацінтана з шостого субкультивування.

5. Виявлений вплив віку рослин-донорів на приживлення та морфогенез регенерантів агапантуса. Зі збільшенням його з 30 до 90 діб приживлення експлантів зросло з 27-31 % у сортів Charlotte, Black magis до 98-100 %, висота пагона з 16-27 мм до 82-107, а кількість пагонів у кущі з 1,1-1,2 шт. до 3,2-3,6. Аналогічне мало місце в туї західної.

За матеріалами досліджень розділу 5 опубліковано 16 наукових праць [103, 115, 116, 118, 122, 127, 131, 133, 139, 143, 155, 182, 186, 210, 275, 337].

## РОЗДІЛ 6

### ДЕТЕРМІНАЦІЯ ОНТОГЕНЕЗУ РЕГЕНЕРАНТІВ В ПРОЦЕСІ МКР

Для рослин, як складних організмів, властиві міжклітинні системи регулювання: трофічне, електрофізіологічне, гормональне. Трофічний тип регулювання відбувається шляхом передавання частинами рослинного організму поживних речовин, метаболітів. Вони відіграють в рослині двояку роль – субстратну (або структурну) та регуляторну (або каталітичну). Регулювання організму відбувається під впливом внутрішніх детермінат та умов оточуючого середовища – екзогенних детермінант (температура, довжина світлового дня та ін.). *In vitro* ці детермінанти мають спільне з нативними умовами, але мають і свої особливості, які потребують дослідження.

#### 6.1. Синергізм трофічних та фізичних детермінант за МКР

В культурі тканин на відміну від звичайних нативних умов зручніше виокреми як вектори впливу детермінанти, в тому числі органічні речовини, наприклад, вуглеводи.

На етапі мультиплікації *in vitro* павловнії встановили вплив температури на швидкість ростових процесів: висота центрального пагона регенеранта та кількість мікропагонів у конгломераті на середовищі з 1,0 мг/л бензиламінопурину (табл. 6.1).

Найвищі біометричні показники отримані за таких температур: 24 °С – найвищий пагін (62,11 мм); 26 - 28°С найбільша кількість мікропагонів ( 2,7-2,8 шт.). Вважаємо, що для мультиплікації оптимальною є температура 26°С. За такої температури є оптимальним поєднання висоти регенерантів й кількості мікропагонів у конгломераті.