

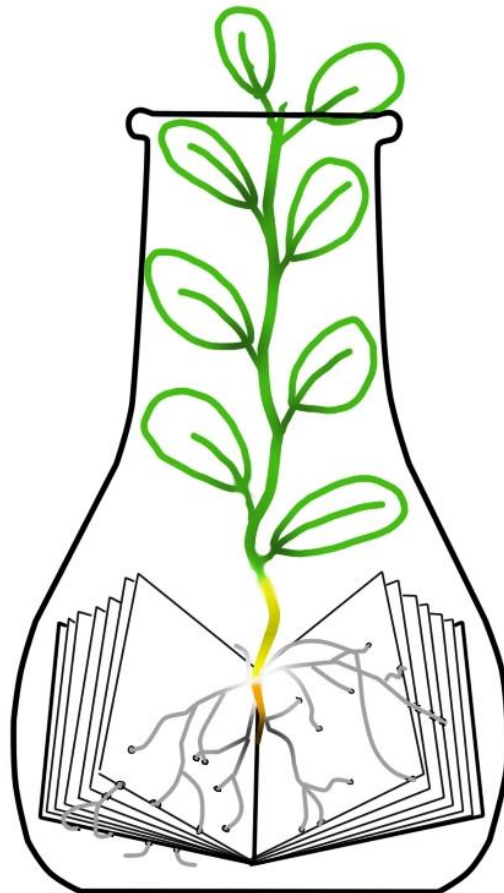
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

А. А. Подгаєцький

В. В. Мацкевич

А. Ан. Подгаєцький

**ОСОБЛИВОСТІ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ
ВИДІВ РОСЛИН**



Біла Церква

2018

УДК 581.146:635.21:631.531

Рецензенти:

Роїк М.В. доктор сільськогосподарських наук, професор, академік НААН, директор Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН

Балашова Г. С. доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, завідувачка лабораторії біотехнології картоплі Інституту зрошеного землеробства НААН

Троценко В. І. доктор сільськогосподарських наук професор, завідувач кафедри рослинництва Сумського національного аграрного університету Міністерства освіти і науки України

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

Монографія присвячена узагальненню результатів власних досліджень та інших вчених з природи мікроклонального розмноження рослин, проблем, які при цьому виникають, пошуку їх вирішення. Викладено підходи удосконалення технологічних процесів із застосуванням культури тканин. Наведено теоретичні обґрунтування ювенілізації *in vitro* та постасептичної адаптації, захисту від реінфекції матеріалу, одержаного біотехнологічними методами.

Розрахована для науковців, науково-педагогічних працівників, студентів вищих навчальних закладів, які навчаються за спеціальностями “Агрономія”, “Біотехнології та біоінженерія”, “Лісове і садово-паркове господарство”, “Захист рослин”, працівників біотехнологічних лабораторій.

Рекомендовано до друку вченою радою Білоцерківського національного аграрного університету (протокол № 5 від 10 травня 2017 року).

ББК 28.54

П 44

ISBN 978-966-2122-61-9

© Подгасцький А.А., Мацкевич В. В., Подгасцький А.Ан.

ЗМІСТ

Умовні скорочення	5
Передмова	6
I. ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТУРИ ТКАНИН В АСЕПТИЧНИХ УМОВАХ ТА ПЕРВИННЕ СУБКУЛЬТИВУВАННЯ	9
1.1. Методика і техніка МКРР (загальні положення)	9
1.2. Відбір, підготовка донорів експлантів та отримання стерильної культури	10
1.2.1. Відбір вихідного матеріалу для введення <i>in vitro</i>	10
1.2.2. Деконтамінація експлантів перед перенесенням <i>in vitro</i>	11
1.2.3. Класифікація деконтамінантів	14
1.2.4. Особливості введення <i>in vitro Agapanthus</i>	25
1.2.5. Вплив виду експлантів на ефективність деконтамінації та морфогенез рослин за МКРР	28
1.3. Оптимізація середовища для регенерації рослин з меристем	30
1.4. Утворення регенерантами фенолоподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від умов та виду рослин	34
1.5. Запобігання утворення фенольних сполук за введення <i>in vitro</i> горіхоплідних культур	39
II. ОСОБЛИВОСТІ ОНТОГЕНЕЗУ РОСЛИН <i>IN VITRO</i>	41
2.1. Старіння і омолодження рослин та органів в онтогенезі	41
2.2. Особливості ювенільного етапу розвитку рослин	42
2.3. Ювенілізація в умовах <i>in vitro</i>	43
2.4. Гетеротрофне живлення як одна з причин ювенільного стану регенерантів в умовах <i>in vitro</i>	50
2.5. Вплив живлення на розвиток листків регенерантів хости	56
2.6. Асинхронний розвиток регенерантів під час МКРР	59
2.7. Вплив способів живцювання та кількості субкультивувань на регенерацію рослин хости з експлантів	68
2.8. Регенерація первинних експлантів та субкультивування <i>Agapanthus</i>	70
2.9. Модифікаційні зміни при вирощуванні <i>in vitro</i>	73
III. ГОРМОНАЛЬНА ДЕТЕРМІНАЦІЯ ОНТОГЕНЕЗУ <i>IN VITRO</i>	
3.1. Регулювання онтогенезу шляхом зміни донорно-акцепторних відносин між органами рослини при культивуванні <i>in vitro</i>	78
3.2. Природа детермінації онтогенезу фітогормонами	88
3.3. Реакція регенерантів картоплі на фітогормони	92
3.4. Детермінація онтогенезу рослин картоплі в умовах <i>in vitro</i> новими синтетичними фітогормонами	95
3.5. Вплив світла, термоіндукції рослин-донорів на фітогормональну детермінацію	100
3.6. Використання гіберелінів спільно із цитокінінами в культурі тканин	104
VI. ТРОФІЧНА ДЕТЕРМІНАЦІЯ ОНТОГЕНЕЗУ РЕГЕНЕРАНТІВ	109
4.1. Ріст і розвиток рослин картоплі <i>in vitro</i> залежно від сорту і консистенції середовища	109
4.2. Використання різних гелеутворювачів для штучних живильних середовищ на регенерацію та бульбоутворення <i>in vitro</i> рослин картоплі з живців	110

4.3.	Вплив мінеральної основи штучних живильних середовищ на онтогенез рослин <i>in vitro</i>	113
4.4.	Вплив концентрації заліза в штучних живильних середовищах на ріст рослин <i>in vitro</i>	117
4.5.	Особливості онтогенезу рослин картоплі на штучному живильному середовищі, модифікованому у Білоцерківському НАУ	122
V	СОМАКЛОНАЛЬНА МІНЛИВІСТЬ <i>IN VITRO</i>	124
VI.	ПОСТАСЕПТИЧНА АДАПТАЦІЯ РОСЛИН <i>IN VITRO</i>	
6.1.	Загальні відомості	127
6.2.	Особливості регенерації рослин картоплі <i>ex vitro</i> з живців залежно від субстрату та площі живлення	132
6.3.	Вплив субстрату на постасептичну адаптацію регенерантів <i>in vitro Thuja occidentalis Smaragd</i>	136
6.4.	Введення регенерантів <i>in vitro</i> у стан спокою як шлях постасептичної адаптації	138
6.5.	Трофічна та гормональна детермінація ризогенезу <i>in vitro</i> регенерантами хости	142
6.6.	Постасептична обробка регенерантів ауксинами	146
6.7.	Захист рослин на етапі <i>in vitro – in vivo</i> від шкідливої мікрофлори ґрунту під час висадки розсади	148
6.8.	Фотоавтотрофний метод МКРР	131
6.8.1.	Вплив розмірів фотоасимілюючих органів на укорінення регенерантів фундука за ФАМКР	150
6.8.2.	Вплив екзогенних фітогормонів на розвиток регенерантів ожини (<i>Rubus fruticosus</i> L.) за ФАМКРР та заходи зниження їх контамінування в постасептичній культурі	151
6.8.3.	Вплив інтенсивності освітлення та вмісту CO ₂ в повітрі на ефективність ФАМКРР ожини	156
VII.	ЗБЕРЕЖЕННЯ ЯКОСТЕЙ МАТЕРІАЛУ, ОТРИМАНОВОГО <i>IN VITRO</i> В ПРОЦЕСІ РОЗМНОЖЕННЯ	158
7.1.	Збереження якостей оздоровленого матеріалу у безвірусному насінництві картоплі	158
7.2.	Система заходів із захисту картоплі від вірусних хвороб	160
VIII.	ПРОТОКОЛИ УДОСКОНАЛЕНИХ ТЕХНОЛОГІЙ МКРР ТА ПОСТАСЕПТИЧНОЇ АДАПТАЦІЇ	165
8.1.	Хоста	165
8.2.	Агапантус	171
8.3.	Туя західна	172
8.4.	Картопля	172
8.5.	Малина	175
8.7.	Ожина	178
8.8.	Актинідія	180
8.9.	Алича, слива персик, підщепи персика	183
	Список використаних джерел	187
	Словник найбільш поширених термінів з МКРР	202

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

МКР(Р) – мікроклональне розмноження (рослин)

MS – живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга.

Hi – живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга в модифікації Інституту картоплярства НААНУ (Д.П. Остапенко)

In vitro – культивування рослинних об'єктів “у склі” (пробірці, колбі, біореакторі) на штучних живильних середовищах в асептичних, часто змодельованих умовах

Ex vitro – перше постасептичне вирощування рослин *in vitro*

In vivo – вирощування матеріалу у природних умовах

De novo – започаткування процесу, наприклад, синтез макромолекули з простих попередніх сполук

Д. р. – діюча речовина

БАП – 6-бензиламінопурин

ІОК – індолілоцтова кислота

ІМК – індолілмасляна кислота

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксицтова кислота

АВК – А вірус картоплі

УВК – У вірус картоплі

ХВК – Х вірус картоплі

SBK – S вірус картоплі

ПЕРЕДМОВА

Біотехнологія рослин – один з найбільш перспективних сучасних напрямів біології взагалі та сільськогосподарської зокрема. Надзвичайно широкий спектр біотехнологічних досліджень щодо рослин вимагає розподілу їх за напрямами використання, предметами та об'єктами, методами залучення в експеримент тощо. Одним із підходів, які широко використовуються в сільськогосподарському, декоративному, лісовому та іншому виробництві, є МКРР. Цей метод успішно поєднується з іншими, наприклад, із оздоровленням рослин від патогенних мікроорганізмів, зокрема, вірусів. Крім цього, широке теоретичне і практичне значення мають створення генетично змінених форм, збереження генетичних банків рослин *in vitro*, підтримання колекції оздоровлених сортів, гібридів із використанням штучних живильних середовищ тощо.

Пошук шляхів прискореного розмноження рослин завжди був актуальним, а тому дослідження в цьому напрямі продовжуються й досі. Основою для їх проведення було бажання мати якнайбільшу кількість рослин, ідентичних клону, який виділився за комплексом агрономічних ознак у природних умовах.

Найчастіше для швидкого розмноження рослин використовують їх частини, які, звичайно, мають точку росту. Водночас, без застосування біотехнологічного методу в насінництві не можна досягти високих результатів із розмноження рослин. Наприклад, за вегетативного розмноження картоплі методами відділення паростків, розмноження відводками, стебловими живцями, вкорінення верхівок та пазушних пагонів, розмноження паростковими живцями можна отримати, використовуючи найбільш ефективні методи, з однієї рослини до 700 нових, а за їх поєднання – до 8 000 [30].

Використовуючи умови *in vitro*, коефіцієнт розмноження картоплі можна довести до 20 000 рослин за 8 місяців [83, 155]. Високі значення коефіцієнту розмноження з використанням біотехнологічного методу отримані також у інших культур. У міскантусу за рік це становить 1: 1 000 000 [140], у цукрових буряків за шість місяців 1: 5 000 [134] і т. п., що не може бути досягнуто застосуванням будь-яких інших методів.

Переваги прискореного розмноження рослин *in vitro* нині зводяться до можливості: 1. використання мінімальної кількості вихідного матеріалу; 2. отримання генетично однорідного матеріалу; 3. накопичення садивного матеріалу у рослин, які мають низький коефіцієнт розмноження, високо цінних або рідкісних у природному середовищі; 4. підтримання генотипів, які характеризуються генетичною стерильністю; 5. збереження в штучних умовах видів, для яких складаються вкрай несприятливі зовнішні умови в процесі вирощування, тобто які зникають із лиця Землі; 6. підтримання і збереження колекційних зразків впродовж тривалого часу [121, 157]; 7. швидкого збільшення площ, зайнятих новими сортами, гібридами; 8. накопичення садивного матеріалу впродовж року і планування необхідного його обсягу до певного строку використання; 9. отримання великої кількості матеріалу на малій лабораторній площі; 10. переривання періоду спокою органів рослин; 11. автоматизація процесів вирощування рослин; 12. виділення форм із зміненою спадковістю; 13. із залученням інших методів отримання оздоровленого садивного матеріалу від патогенної інфекції тощо.

Клонування в традиційному розумінні – це масове вегетативне розмноження матеріалу, у результаті чого отримуються потомки, аналогічні, в генетичному відношенні, вихідній формі. Ця особливість методу знайшла широке застосування на практиці. Для окремих видів рослин (картопля, топінамбур, суниця тощо) цей спосіб домінуючий для отримання врожаю. Водночас, морфологічна відмінність між рослинами в полі, наявність латентної інфекції ставлять особливі вимоги до відбору матеріалу для клонування.

Більшість учених використання біотехнологічного методу для розмноження рослин називають мікроклональним розмноженням [78, 107, 134] Проте, нерідко зустрічається термін «клональне мікророзмноження рослин» [45, 83, 138, 140].

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

Мікроклональне розмноження рослин (МКРР) – це спосіб безстатевого розмноження багатоклітинних частин рослин, основу якого становить прискорене отримання численних генетично ідентичних форм вихідній частині із застосуванням біотехнологічних методів.

Незважаючи на тривалі результативні дослідження щодо МКРР в Україні й за рубежом та вирішення основних завдань з використанням методу, окремі проблеми й досі залишаються відкритими. Насамперед, це стосується енергозбереження за МКРР, підвищення адаптивності матеріалу на етапі *in vitro* – *in vivo* тощо.

Основу МКРР становить можливість утворення повноцінних рослин з окремих органів або частин рослин, які обов'язково повинні мати зачаток пагона. Можна регенерувати рослини *in vitro* з вегетативних органів і навіть, з окремих клітин (тотипотентність рослинних клітин). Але останнє можна здійснити через калюсогенез і формування ембріоподібних органів, що не завжди гарантує ідентичність одержаного насінневого матеріалу.

Цінність МКРР полягає в 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* дозволяє використовувати пробірковий матеріал для біотехнологічних, генетичних, фізіологічних, мікробіологічних та інших досліджень.

Крім дотримання загальних біотехнологічних вимог, успіх МКРР залежить і від специфічних чинників: фізіолого-біохімічного стану експланта, складу живильного середовища, умов культивування [134] та інших.

Експериментальний морфогенез *in vitro*, до якого відноситься МКРР, настільки науково відпрацьований, що знайшов надзвичайно широке практичне застосування, тобто його використання вийшло за межі наукових лабораторій. Водночас, науковий пошук не має права зупинитися на досягнутому, а тому стосовно МКРР удосконалюються технології, досліджуються нові підходи для більш ефективного практичного використання методу тощо. Яскравим прикладом викладеного може бути результативність використання біотехнологічного методу в насінництві картоплі. На першому етапі оздоровлений і розмножений матеріал для переходу *in vitro* - *in vivo* висаджувався розсадою. Згодом виявлена можливість утворення в пробірковій культурі мікробульб, які можна більш успішно, порівняно з розсадою, вирощувати *in vivo*. У подальшому розроблені гідропонні, аеропонні технології для отримання садивного матеріалу і, на кінець, сучасні технології швидкого розмноження оздоровленого матеріалу фотоавтотрофним методом в середовищі зі збільшеним вмістом CO₂, інтенсивним освітленням та з використанням різноманітних біореакторів. Проте, вважаємо, що на цьому подальше вдосконалення біотехнологічного методу в насінництві картоплі не зупиниться, а матиме продовження.

У виданні зроблена спроба узагальнити особливості МКРР окремих видів рослин з висвітленням специфіки процесу, включаючи адаптаційні, які мають місце на етапі *in vitro* - *in vivo*.

I. ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТУРИ ТКАНИН В АСЕПТИЧНИХ УМОВАХ ТА ПЕРВИННЕ СУБКУЛЬТИВУВАННЯ

1.1. Методика і техніка МКРР (загальні положення)

Залежно від потреб виробництва та спеціалізації біотехнологічних лабораторій застосовуються різні методи МКРР у асептичних умовах. Особливості їх у виборі оптимальної моделі культивування *in vitro*, що тісно пов'язано з біологічною специфічністю видів рослин. Відомі фактори, кожний із яких, окремо або в поєднанні з іншими, впливає на розвиток регенерантів. Серед них найбільш важливими є: тип експланта, генотип рослини, умови культивування донорських рослин, особливості складу штучних живильних середовищ, фотоперіод та інше.

Досі не існує єдиної класифікації методів МКРР. Найбільш визнаною є така (за [55]), де вони поділяються на дві групи. До першої відносять ті з них, які передбачають активацію вже існуючих у рослині меристем (апекси, пазушні або сплячі бруньки). Наприклад, у разі живцювання пагона з бруньки, що знаходиться в пазусі листа, відростає новий пагін та утворюється коріння і, таким чином, регенерується нова рослина (рис. 1.1). Друга група – це індукція утворення бруньок або ембріодів *de novo*, що може відбуватися трьома шляхами: *a* – з утворенням організованих структур безпосередньо зі спеціалізованих тканин експланта (репродуктивних органів, епідермісу, субепідермальних тканин, мезофілу листа); *b* – через одержання первинного калюсу, утвореного клітинами експланта; *в* – з використанням пересадної калюсної тканини або клітин, що ростуть у суспензійній культурі.

Основною відмінністю двох груп методів МКРР, на яку в першу чергу звертають увагу на виробництві, є різниця між рослинами, що регенеруються із меристем, а саме: а) рослини *in vitro* генетично ідентичні вихідній формі (перша група методів); б) рослини *in vitro* утворені зі спеціалізованих і калюсних клітин, в яких є певна ймовірність зміни генетичної інформації. Перша група методів використовується для прискореного розмноження в насінництві, друга – переважно, в селекційних цілях.



Рис. 1.1. Регенерація *in vitro* хости із живця

У культурі *in vitro* виділяють чотири етапи: 1. відбір, підготовка донорів - експлантів та отримання стерильної культури; 2. прискорене розмноження *in vitro*; 3. Індукція ризогенезу; 4. адаптація в умовах *in vivo*. Усі вони характеризуються не лише відмінністю методичних підходів у процесі культивування, але й різними вимогами до навколишнього середовища, хоча спільним для них є використання культури *in vitro*. У сучасних дослідженнях ще виділяють окремо 4 етап, у процесі якого пробіркові рослини переносять з умов *in vitro* для вирощування в ґрунт [78], тобто вони повинні пройти постасептичну адаптацію. Рослини, які з асептичних умов (*in vitro*) перенесені в нестерильні умови (*in vivo*) у процесі їх первинного вирощування характеризуються як умови *ex vitro*.

1.2. Відбір, підготовка донорів-експлантів та отримання стерильної культури

1.2.1. Відбір вихідного матеріалу для введення *in vitro*

Особливість культури *in vitro* у можливості використання для розмноження в штучних умовах найрізноманітніших частин рослин. Ними можуть бути кінчики стебел, різного походження бруньки, зародки та інші меристематичні тканини, а в деяких випадках молоді листки, черешки, суцвіття тощо.

Великою мірою ефективно практичне використання розмноженого матеріалу в штучних умовах залежить від правильного відбору вихідного матеріалу для виділення експлантів.

У методичних рекомендаціях вказується на необхідність відбору для введення *in vitro* матеріалу здорового від інфекції, зокрема вірусної. Результати оцінки наявності вірусної інфекції в диких видів картоплі свідчать, що навіть у візуально здорових рослин мала місце її латентна форма, і вона зростала в результаті бульбового розмноження матеріалу *in vivo*, чим і обумовлюється присутність у польових умовах вірусної інфекції, проте відсутність бактеріальної, грибної інфекцій можна досягти.

Потенціал вихідного матеріалу для введення *in vitro* не обмежується лише наявністю вірусної інфекції як найбільш шкідливої за природою розміщення в клітині, але й обумовлюється тими фізіолого-біохімічними процесами, на основі яких формується врожай. Тому експланти необхідно відбирати не лише від рослин, діагностованих на наявність інфекції, але і з високим потенціалом за комплексом агрономічних ознак.

Дуже важливо, щоб експланти характеризувалися генетичною ідентичністю вихідним рослинам, а також стабільно зберігали її в процесі культивування *in vitro*. Вегетативне розмноження передбачає ідентичність одержаного матеріалу, а тому будь-які спадкові відхилення недопустимі.

Для введення в культуру *in vitro* цукрових буряків відбираються пазушні бруньки коренеплідів та висадків, які не мають симптомів ураження хворобами і характеризуються великими розмірами. Найкраще проводити добір матеріалу вранці (9-10 год.) за високого тургору в рослин. Щоб не втрачати його, зрізані бруньки розміщують у зволоженому фільтрувальному папері, який додатково кладуть у поліетиленові пакети. Дуже важливим є швидке введення відібраного матеріалу в культуру *in vitro* – не пізніше, ніж через 2-4 години. В іншому випадку збільшується інфікованість бруньок і погіршується їх приживлення [134].

Для міскантусу вихідним матеріалом може бути насіння, ризоми і міжвузля. Враховуючи значну відмінність його за інфікованістю, методи стерилізації у кожному випадку повинні бути специфічними [140].

У процесі МКР картоплі найчастіше вихідним матеріалом використовують верхівкові меристеми паростків, бруньок тощо [155].

1.2.2. Деконтамінація експлантів перед перенесенням *in vitro*

Успіх МКРР неможливий без отримання стерильного матеріалу і дотримання таких умов в процесі культивування. Від проходження першого етапу залежить можливість залучення рослинного об'єкту в селекційний і (або) насінницький процес з використанням культури тканини. Тому для введення в асептичну культуру матеріалу *in vivo* обов'язковим є стерилізація експлантів. Це пов'язано з тим, що поверхневі покриви органів рослин заселені різноманітними грибами, бактеріями. Крім цього, останні за умов потрапляння в штучне живильне середовище (рис. 1.2) 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 спричиняють їх загибель [55].

Щоб уникнути викладеного вище, застосовують деконтамінацію, тобто знищення патогенної екзофітної 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 [66]. Причинами відсутності забруднення внутрішньої тканини є слабозвинені провідні пучки, які не доходять до меристематичного куполу, та вузькі плазмодесми, що запобігає проникненню інфекції у верхівкову меристему. Ці перепони в більшості випадків не пропускають навіть найдрібніших мікроорганізмів – вірусів, а щільно розташовані покривні листки слугують своєрідним бар'єром між меристемою та оточуючим середовищем.

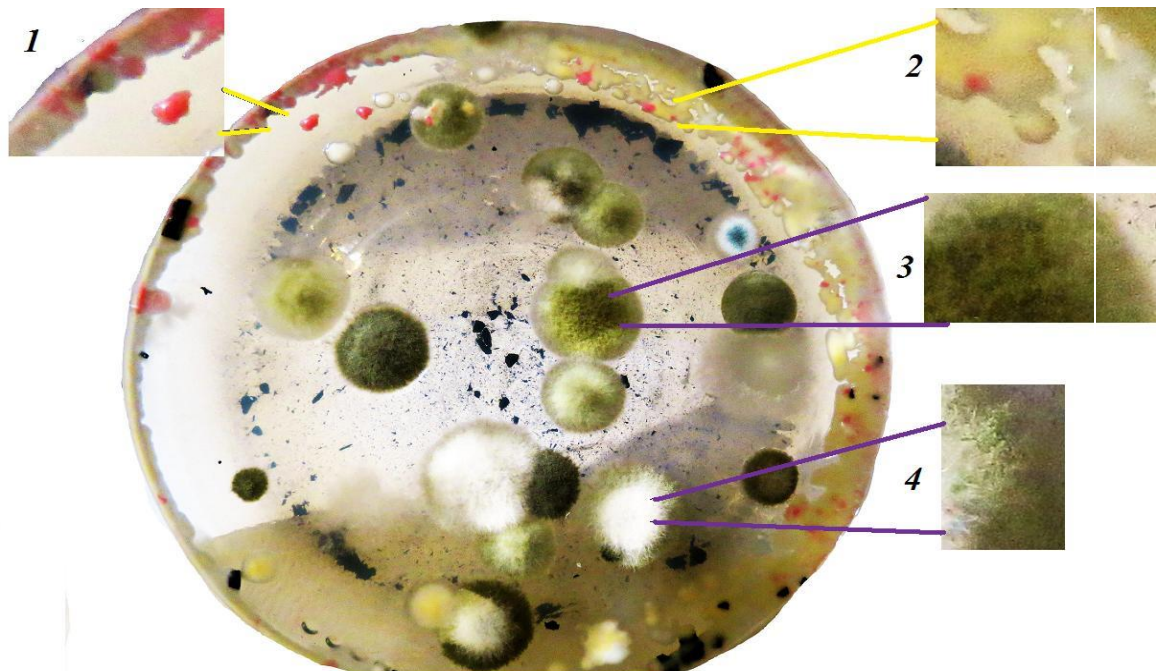


Рис. 1.2. Контаміноване штучне живильне середовище: 1, 2 бактеріальне (*Pseudomonas* та ін.); 3, 4 грибе (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis* та інші).

Вважається, що легше стерилізуються біологічні об'єкти, які мають покривні тканини без опушення та шершавостей, наприклад, насіння. Водночас, деконтамінацію такого матеріалу слід проводити до намочування в стерильній воді. У противному випадку частка інфікованих експлантів може становити до 80% [55].

Водночас, внутрішні тканини здорових рослин, які вважаються стерильними, можуть мати непатогенні бактерії, що не завжди виявляються [56]. Наприклад, широко застосовуються технології одночасного вирощування мікроорганізмів з рослинами, зокрема картоплі і бактерій роду *Pseudomonas*, [61], чи деревних рослин і мікоризних грибів [32].

Основною умовою успішного асептичного культивування є стерилізація внутрішніх тканин без їх пошкодження. Ефективність процесу (E_1) визначають [79] за кількістю неінфікованих експлантів після стерилізації (c) у відсотках до вихідної кількості експлантів, що стерилізувалися (s):

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

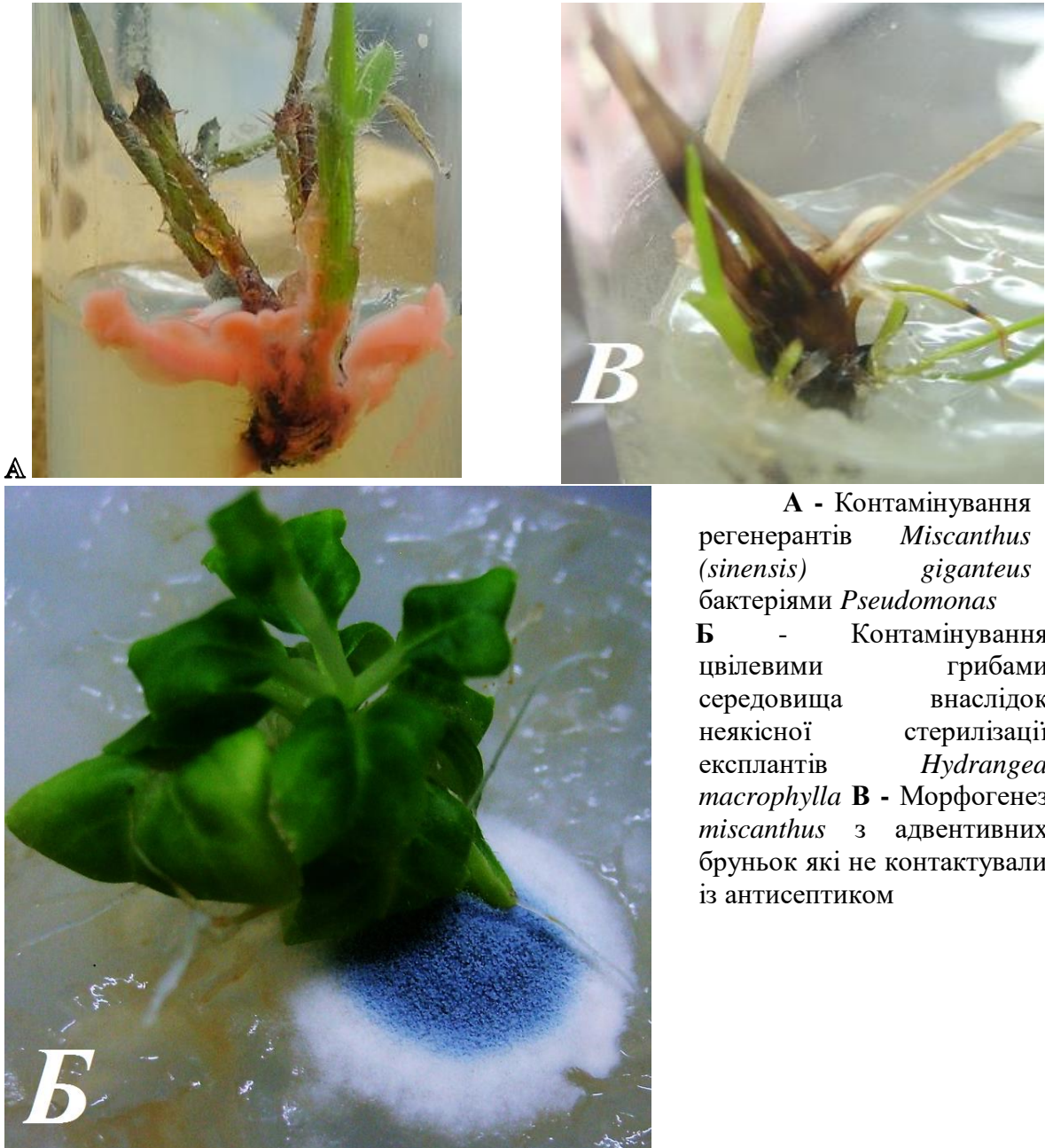
Вплив стерилізуючої речовини залежить від її виду, концентрації, підготовки експлантів та експозиції. Крім цього, успішне проходження процесу залежить від щільності та чутливості тканини, що контактує із антисептиком (рис. 1.3). Вдалий відбір стерилізуючого агента полягає в тому, щоб він був дуже активним стосовно всіх мікроорганізмів і водночас найменше пошкоджував тканини рослин.

Труднощі, пов'язані із проблемою деконтамінації, особливо проявляються в об'єктів, що мають пошкодження та інші шляхи проникнення антисептика глибше покривних тканин, органів. У таких випадках відбувається пригнічення росту експлантату 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 непошкоджених внутрішніх тканин, що не контактували з антисептиком, так, як це зображено в частині «в» рисунку 1.3. Типовими пошкодженнями також є травми, отримані під час відокремлення експлантів від материнської рослини. В таких випадках антисептик може проникати й рухатися як по міжклітинниках, так і дальнім транспортом по елементах провідних пучків і гальмувати в подальшому ріст в культурі *in vitro*.

Важливою умовою успішного проходження стерилізації є легке видалення з експлантів активного агента шляхом промивання його стерильною (найчастіше дистильованою та автоклавованою) водою, або він повинен легко розкладатися, як це відбувається у випадку стерилізації перекисом водню.

Передує стерилізації звільнення експланта від бруду. Для цього, зазвичай, використовують пральні засоби або ж його занурюють у спирт. Додавання невеликої кількості поверхнево активних речовин (детергентів), наприклад, Твін 20, Твін 80 поліпшує процес звільнення від бруду. Особливо необхідно їх використовувати під час роботи з тканинами, які погано змочуються (наприклад рододендрон [161]) або вкриті воском, що підвищує ефективність стерилізації та дозволяє скоротити її експозицію. Спирт зменшує кількість бруду і завдяки своїм фізико-хімічним властивостям віднімає воду з поверхні експланта та підвищує ефективність застосування стерилізуючих речовин [56].



А - Контамінування регенерантів *Miscanthus (sinensis) giganteus* бактеріями *Pseudomonas*
Б - Контамінування цвілевими грибами середовища внаслідок неякісної стерилізації експлантів *Hydrangea macrophylla*
В - Морфогенез *miscanthus* з адвентивних бруньок які не контактували із антисептиком

Рис. 1.3. Різні прояви дії деконтамінатів: **А** та **Б** без пошкодження поверхні над живильним середовищем; **В** з пошкодженням поверхневих тканин

1.2.3. Класифікація деконтамінантів

Незважаючи на те, що методи асептичного вирощування рослин були розроблені ще в першій половині минулого століття, найбільш поширеною і понині залишається хімічна стерилізація рідкими, рідше газоподібними речовинами, хоча відомі розробки з використанням фізичних реагентів, наприклад, обробка ультразвуком [79], ультрафіолетовими променями. 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 (AgNO_3), спирти (етилловий, ізопропіловий) або суміш декількох активних речовин. У деяких випадках, особливо коли інфекція міститься не тільки на поверхні експлантату, але й присутня глибока контамінація, застосовують фунгіциди [153, 161] та антибіотики [153, 206].

Гіпохлорити. Це солі гіпохлоритної кислоти. Вони 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 [60]. Найпоширеніми з них є гіпохлорит натрію (NaClO) і гіпохлорит кальцію $\text{Ca}(\text{ClO})_2$. Останній являє собою основну частину, так званого, хлорного вапна.

Гіпохлорити, переважно гіпохлорит натрію, застосовують для деконтамінації різних експлантів. Гіпохлорит натрію у формі 0,5-5 % розчинів з експозиціями від 1 до 20 хв., а інколи й більше, використовують для деконтамінації таких експлантів: насіння, пагонів, бруньок (табл. 1.1). Застосовують також своєрідну модифікацію гіпохлоритів – хлорокс, який є комерційним препаратом 5,25% розчину гіпохлориту натрію у воді і, крім цього, містить сліди перманганату калію [117].

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. Тому застосування гіпохлориту для стерилізації не завжди дає позитивні результати. Крім цього, високі концентрації або тривалі експозиції препарату призводять до токсикації рослинних тканин.

У випадку зменшення впливу стерилізуючого агенту збільшується відсоток інфікування, що потребує повторних стерилізацій, а в разі інфікування сапрофітними мікроорганізмами – до загибелі експлантів. Тому нами випробувано різні схеми застосування у комплексі з гіпохлоритом (комерційний препарат «Білизна») двох і більше стерилізуючих агентів: нітрат срібла, фундазол (д. р. беноміл), етанол, перманганат калію на експланти хости сору Паульс Глорі [94].

Після стерилізації 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 стерилізуючими розчинами 20 хв. Фундазол, перманганат калію додавали в стерилізуючий розчин з автоклавованою водою та гіпохлоритом натрію розведеним з автоклавованою дистильованою водою 1:2. Етанол, використовували перед обробкою гіпохлоритом натрію (1-2 хвилини). Нітрат срібла (5 мг/л) додавали в живильне середовище.

Встановили, що частка приживання та контамінування експлантів залежала від сумісного застосування гіпохлориту натрію з іншими стерилізуючими агентами (рис 1.4). Оскільки, стерилізуючі речовини діяли токсично як на контамінанти, так і тканини експлантів [78], виживала лише частина експлантів.

Найменше прижилося експлантів у варіанті із застосуванням етанолу (37%) та в контролі (46%). Стерилізація з гіпохлоритом натрію та нітратом срібла або фундазолом збільшувала частку життєздатних експлантів. Припускаємо, що причиною цього могло бути зменшення фітотоксичності хлору через дію інших компонентів. Зокрема, за додавання фундазолу із стерилізуючого розчину виділявся в повітря хлор, про що свідчив його запах.

Таблиця 1.1

Приклади застосування гіпохлоритів для деконтамінації експлантів

Джерело і тип експлантів	Речовина	Концентрація (%) / експозиція (хв.)	Примітка	Посилання
Проростки картоплі, інокульовані ризобактеріями <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Гіпохлорит кальцію	5/15		[190]
Верхівкові та пазушні бруньки		6/3-6		[207]
Зернівки ячменю	Гіпохлорит натрію	(1:3) комерційного препарату «Білизна» / 20		[126]
Листки <i>Caladium hortulanum</i>	Те саме	1,8/5	З наступною стерилізацією в етанолі	[52]
Шматки стебла <i>Sclerocactus spinosior</i>	Те саме	(1:2) комерційного препарату «Білизна»/ 20	Сумісно з перманганатом калію	[94]
Напівздерев'янілі пагони жимолості, актинидии, лимонника, елеутерококка	Те саме	(1:2) комерційного препарату «Білизна»/ 5-7		[173]

Найменша фітотоксичність гіпохлориту відмічена за додавання перманганату калію в концентрації 0,05 мг/л. Застосування цієї суміші дозволило зберегти живими 96% експлантів. У подальшому навіть збільшення експозиції вдвічі та концентрації гіпохлориту (суміш «білизна» й води була у співвідношенні 1:1) сумісне їх застосування зберігало невисоку фітотоксичність (7% загиблих експлантів). Подібна суміш, але з іншими концентраціями, відома як препарат «Хлорокс» [56, 88].

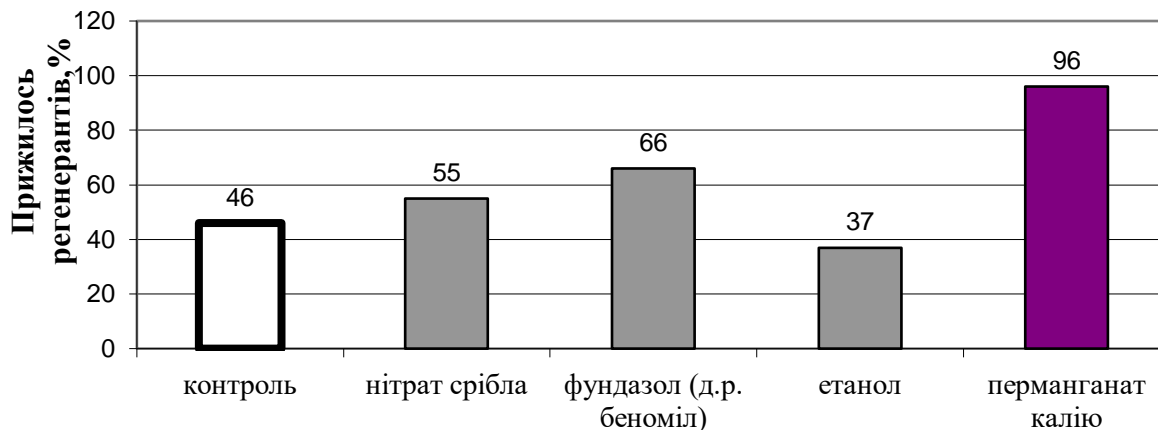


Рис. 1.4. Вплив використання стерилізуючих агентів в комплексі з гіпохлоритом натрію на приживання (%) експлантів хости сорту Пульс Глорі.

Серед експлантів, які вижили, рівень контамінування залежав від компонентів стерилізуючого розчину (рис. 1.5). У випадку застосування одного гіпохлориту натрію (контроль) контамінованими були 67% експлантів. У цьому варіанті вони мали опіки покривних тканин, місць зрізу та вповільнений морфогенез. Додавання до гіпохлориту натрію перманганату калію знижувало контамінування лише на 4 відсотки, але експланти не мали опіків і регенерували рослини. Інфіковані експланти за такої схеми стерилізації витримували дві-три повторні стерилізації.

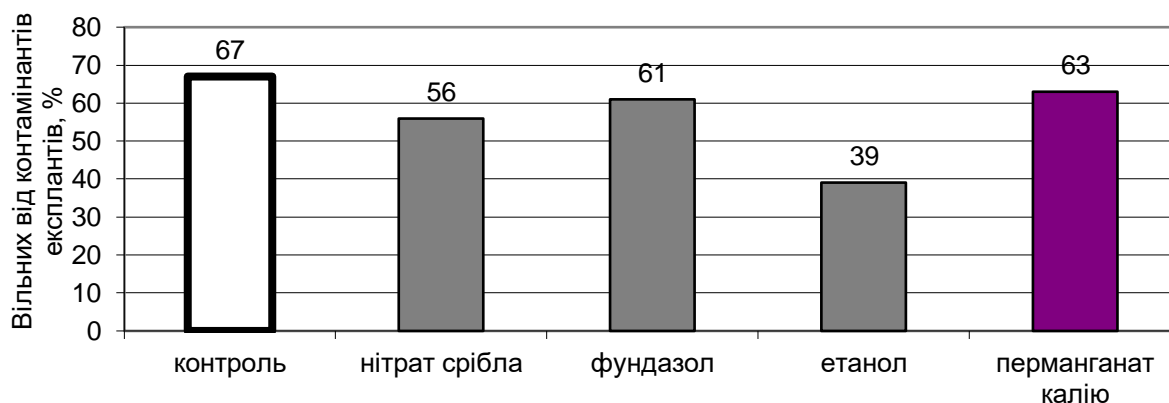


Рис 1.5. Вплив використання стерилізуючих агентів в комплексі з гіпохлоритом натрію на звільнення від контамінантів, % експлантів хости сорту Паульс Глорі.

Через порівняно швидке розкладання гіпохлориту натрію складно визначити кількість речовини, необхідної для приготування стерилізуючого розчину. Досліджували ефективність стерилізації залежно від умов зберігання маточних розчинів. Виявлено меншу частку контамінованих експлантів після короткого строку зберігання розчину (15 днів з моменту розфасування препарату) (табл. 1.2). За умови зберігання розчину на світлі 60 днів стерилізуючий ефект його втрачався і лише 6% експлантів були вільними від інфекції, проте за зберігання розчинів у темряві це становило 28%.

Втрата стерилізуючого ефекту супроводжувалася зміною забарвлення розчину за розведення 1:2 з автоклавованим дистиллятом із типового марганцевого на синій, а потім буро-зелений. Чим «старіший» був розчин, тим швидше відбувалася зміна кольору.

Звичайно, швидше змінювався колір маточних розчинів, які зберігалися на світлі. Таким чином, швидка зміна кольору розчину може бути індикатором втрати гіпохлоритом натрію стерилізуючого ефекту.

Таблиця 1.2

Ефективність стерилізації експлантів розчином гіпохлориту натрію та перманганату калію залежно від умов зберігання першого з них, %

Днів з моменту розфасування препарату		15	30	45	60	НІР ₀₅
Умови зберігання гіпохлориту натрію	на розсіяному світлі	35	26	13	6	6
	в темряві	37	33	31	22	4
НІР ₀₅		5	4	5	6	

Хлорамін. Це розчинна в холодній воді неорганічна сполука – хлорпохідна аміаку, що розкладається за температури вище 40 °С [31]. Діє на рослинну тканину слабше, ніж гіпохлорити кальцію й натрію. Хлорамін застосовувався ще в минулому столітті Морелем для стерилізації коренів кукурудзи [56]. Його також успішно використовують нині, зокрема для деконтамінації експлантів гербери [95] та в медицині для стерилізації інструментів [31].

Натрієва сіль дихлорціануронової кислоти. Ще одна речовина, яка нами випробування як хлорвмісний деконтамінант. Перевага її в тому, що вміст активного хлору у неї, порівняно із гіпохлоритами, майже не змінюється. За консистенцією це порошок або гранули, чи пігулки. В Україні випускається під торговою маркою Бланідас 300 (виробник ООО Бланідас Україна). Вміст діючої речовини 80,52%. Дозволена для застосування в медичних, ветеринарних закладах. Використовується для обеззараження води, фруктів, овочів, яєць. Має широкий спектр протимікробної активності (віруліцидна, бактерицидна, фунгіцидна, спороцидна).

Нами із застосуванням цього деконтамінанта розроблено комплекс заходів для отримання асептичних первинних експлантів:

1. Підготовчий етап вирощування маточних 1-2 річних рослин в умовах закритого ґрунту депозитарію з інтенсивним хімічним захистом від потенційних контамінантів. Це переважно сапрофітна непатогенна мікрофлора, що в майбутньому може потрапити з рослинним матеріалом в живильне середовище. Первинна обробка, особливі умови вирощування в депозитарії зменшують забруднення первинних експлантів та знижують виділення ними в живильне середовище фенолоподібного ексудату.

2. Використання експлантами бруньок, що відновили ріст. Ізоляцію проводять так, щоб біля бруньки залишалася невелика, розміром в 0,2-0,5 мм, п'ятка.

3. Перед деконтамінацією ізольований первинний матеріал на одну годину замочується в антиоксидантному розчині із цистеїном та аскорбіною кислотою.

4. Для захисту від глибинного контамінування бруньки переносяться в розчин системного фунгіциду Превікур Енерджі.

5. Після згаданих вище попередніх обробок застосовують основну – 20 хвилинну розчином натрієвої солі дихлорціануронової кислоти (0,7 г препарату Бланідас 300 на 100 мл автоклавованого дистилляту).

6. Промивання матеріалу проводять тричі в автоклавовану дистилляті.

7. Бруньки звільняють від верхніх листків і висаджують на живильне середовище.

Наведена схема деконтамінації дозволяє успішно подолати інфекцію експлантів як травянистих, так і деревних рослин, наприклад, фаленопсис, актинідія, малина, ожина, кизил).

Ртутювмісні препарати. Найчастіше – це сулема та двохкомпонентний препарат діюцид. Через уміст у препаратах хімічного елементу ртуті, вони є небезпечними речовинами для людини. Раніше їх широко використовували, зокрема діюцид, в меристемно-тканевій культурі за оздоровлення сортів картоплі [36]. Ртуть відноситься до речовин першого класу небезпеки, тобто надзвичайно небезпечних хімічних речовин [37]. Останнім часом дослідники намагаються уникати застосування для стерилізації експлантів препаратів, що містять ртуть.

Перекис водню. Це відомий окисник. Значним позитивом застосування його для деконтамінації є те, що після стерилізації не потрібно тривалого промивання тканин водою – достатнім є одне.

Як стерилізуючі речовини-окисники також використовують озон, етиленоксид, пропіленоксид. Досить ефективним деконтамінантом є бетапропілактон. Ця речовина в 25 раз ефективніша формальдегіду, але, на жаль, вона токсична і канцерогенна, що в 400 разів перевищує окис етилену [37].

Етиловий спирт. Використовується в концентрації 90-95% для попередньої стерилізації об'єктів та покращення 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 орхідних: *Comperia comperana*, *Platanthera chlorantha*, *Goodyera repens* застосовувалася обробка їх підземних органів етанолом до 1 хв. з наступним застосуванням інших стерилізаторів. Водночас для пуп'янків і квіток достатнім було занурення в етанол на 30 с [155]. Найчастіше застосовується ступінчата деконтамінація: перша обробка C_2H_5OH до 1 хв, і наступна хлорвмісним препаратом [184, 187, 195].

Бактерицидні властивості мають також органічні і неорганічні **кислоти**. Їх спороцидна активність пов'язана із здатністю іонів H^+ викликати апуринізацію ДНК за температури $+70^\circ C$. Тому вони можуть застосовуватися для стерилізації середовищ. Після проходження процесу кислоти нейтралізують стерильними розчинами лугів [130].

Для деконтамінації експлантів, зокрема за обробки насіння, застосовують сірчану кислоту. Крім стерилізуючого ефекту це своєрідна скарифікація насіння, яка сприяє газо- і водонепроникності оболонки і, як наслідок, прискорює проростання насіння [56].

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

Причиною застосування антибіотиків є те, що тканини здорових рослин можуть бути колонізовані бактеріями, які дістали назву бактерії-ендофіти. Ще в 1951 році Hollis J.P. [194] довів, що бактерії проникають з ґрунту у середину стебла, насіння та бульби картоплі. Наявність будь-яких бактерій, особливо ендofітних, у рослинних експлантів є суттєвою проблемою для лабораторій, що займаються культурою тканин рослин [216].

Бактерії, в тому числі ендofіти, що залишаються після поверхневої стерилізації експлантів, якщо відразу не проявляються, то потрапляють в рослини-регенеранти, накопичуються у них і розповсюджуються під час МКРР. Забруднення ними також може відбуватися внаслідок порушення режиму стерильності під час культивування або неефективного знезаражування поживних середовищ [220]. Наприклад, у рослинах картоплі *in vitro* було ідентифіковано вид бактерій *B. pumilus*. Забруднення нею культури тканин стало більш помітним під час використання прозорих агентів, на яких мікробні забруднення є помітнішими, ніж на напівпрозорих агарових середовищах, де присутність бактерій маскувалася. У наших дослідженнях як прозору гелеутворюючу речовину використовували агент гелам гумі (гуарова камедь – Е 418) [95]. Проте, повністю звільнитися від ендofітного забруднення вдалося, лише застосовуючи антибіотики. Отримані регенеранти виявилися вільними від інфекції на всіх рівнях тестування рослин [97].

Інфекційне забруднення експлантів грецького горіха дослідила Т. Є. Тітаренко [151]. У випадку використання здерев'янілих живців не вдалося отримати жодного стерильного експланта, а із збільшенням стерилізуючого навантаження мала місце некротизація тканин. Щодо етиольованих живців, то всі отримані з них експланти виявилися інфікованими бактеріями. За збільшення тривалості впливу стерилізуючих речовин (70%-й розчин етанолу > 10 сек. + 0,1%-й розчин HgCl₂ > 2 хв. або 0,3%-й розчин AgNO₃ > 4 хв.) спостерігали інтенсивне виділення в середовище фенольних речовин із подальшою некротизацією експлантів. Найбільш вдалим виявилися спроби введення *in vitro* горіха грецького із використанням зелених живців. Це дозволило отримати певну кількість стерильних експлантів із життєздатними тканинами. Живці з багаторічних дерев мали високий ступінь інфікованості поверхні різноманітними епіфітними бактеріями. У них також виявлена внутрішня інфекція, яка важко усувається звичайними методами стерилізації.

За способом додавання в середовище і термостійкістю антибіотики можна розділити на дві групи. До першої відносяться термолабільні. Їх можна використовувати, застосовуючи мікрофільтри, і додавати в проавтоклавоване середовище і охолоджене до 45-55 °С. Це більшість антибіотиків, що використовуються для контамінації експлантів, наприклад, стрептоміцин, цефатоксин та інші. Цефатоксин в концентрації 400 мг/л успішно застосовувався для додаткової стерилізації горіха (*Juglans regia* L.) після поверхневої деконтамінації експлантів гіпохлоритом натрію [152]. Його також можна використовувати до введення в асептичні умови, наприклад, із експлантами горіху. За тиждень перед введенням у культуру *in vitro* їх обробляли водним розчином цефатоксину з концентрацією 200 мг/л.

До другої групи відносять порівняно термостабільні антибіотики, тобто які витримують високі температури під час автоклавування. Їх можна додавати до середовища перед автоклавуванням. Це зокрема левоміцетин (хлорамфенікол), гентаміцину сульфат. Слід зазначити, що левоміцетин входить до складу агару, який використовується для приготування селективних середовищ, що знищують бактерії. Відомим є застосування бенгальського рожевого агару (DRBC) з дихлораном та хлорамфеніколом. Дихлоран та рожевий агар перешкоджають росту плісняви, виконуючи роль фунгіцидів, а левоміцетин інгібує ріст бактерій [55]. Останній ефективний у кількості 100 мг/л для деконтамінації експлантів ірису від ендоефітних бактерій родів *Ervinia* та *Pseudomonas* [152].

Вводячи експланти хости в асептичну культуру нами встановлено, що застосування гіпохлориту натрію та перманганату калію звільняє від інфекції, відповідно, 61 та 67 відсотків експлантів сортів Патріот та Гіацінтіана (табл. 1.3). Проте, така суміш не вирішує проблему глибокого контамінування ендоефітною мікрофлорою. Оскільки більшість експлантів після перших днів асептичного культивування були візуально забруднені бактеріальною інфекцією, то в живильне середовище перед автоклавуванням додавали термостабільні антибіотики з бактерицидною дією: левоміцетин, гентаміцину сульфат.

Таблиця 1.3

Ефективність деконтамінації антибіотиками експлантів хости (*Hosta gybrida*)

Антибіотик	Період вирощування, днів	Сорт			
		Патріот		Гіацінтіана	
		прижилося, %	контаміновано, %	прижилося, %	контаміновано, %
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 ₀₅		4	7	5	6

Експланти, що залишилися контамінованими після стерилізації гіпохлоритом натрію та перманганатом калію були в подальшому висаджені на середовище з антибіотиками, що позитивно вплинуло як на їх виживання, так і на звільнення від інфекції. Додавання левоміцетину у середовище, де впродовж 5 днів вирощували контаміновані експланти сорту Патріот, зменшувало кількість контамінованих рослин з 100 до 49 %, а за культивування 60 днів – до 36 %.

Подібне відмічено в сорту Гіацинтіна. На 15-й день культивування в середовищі з гентаміцин сульфатом було на 4-6 % більше контамінованих експлантів, порівняно із середовищем, що містило левоміцетин. Окрім цього, середовище, до складу якого входив гентаміцину сульфат, набувало рідшої консистенції, внаслідок чого експланти занурювалися глибше в розчин, порівняно з використанням левоміцетину.

Сумісне застосування половинних концентрацій обох антибіотиків, порівняно із повними, але окремими, на 15-17 % збільшувало загибель експлантів та підвищувало кількість деконтамінованих. Продовження періоду культивування в середовищах із двома антибіотиками спричинило зростання відсотку загиблих експлантів та зменшувало кількість контамінованих. Отже, після стерилізації гіпохлоритом натрію і перманганатом калію залишається глибинне інфікування. Контаміновані експланти доцільно пересаджувати на середовище з левоміцетином.

Консерванти та інші речовини. У США розроблено препарат РРМ™ (*Plant Preservative Mixture™*), який є термостабільним і пригнічує розвиток мікрофлори на середовищах за МКРР [181, 182]. Це суміш консерванту та біоцидів.

РРМ™ являє собою широкий спектр консерванту та біоцидів, які вбивають клітини бактерій, грибів, запобігають проростанню спор, а в більш високих концентраціях можуть усунути в експлантів ендogenous зараження.

Результати дослідження засвідчили, що активні інгредієнти РРМ™ проникають у стінки клітин грибів або бактерій, пригнічують активність ключових ферментів центральних метаболітичних циклів, таких як цикл лимонної кислоти і ланцюги перенесення електронів [180, 209]. РРМ™ можна застосовувати як стерилізуючий розчин (50%) або додавати в живильне середовище в концентрації 0,05-0,1 % РРМ™ для трав'янистих рослин і 0,2 % для деревних рослин [182, 182]. За використання середовища із РРМ™ експланти мають бути повністю занурені в нього, тому що на частинах рослин, які не контактують з препаратом, розвиватимуться мікроорганізми.

Нами за введення в асептичні умови двох видів біоенергетичної верби: *Salix viminalis* (верба прутовидна, природна форма) і *Salix triandra x viminalis* (сорт Інгер) проведено порівняння ефективності застосування РРМ поряд із застосуванням антибіотиків та фунгіцидів (табл. 1.4). Візуально встановлено, що основу контамінантів становили бактеріози. Проте, додавання ефективного для інших культур деконтамінанта антибіотика хлорамфеніколу або фунгіциду Превікуру виявилось неідеальним. На складність деконтамінації також впливав вид рослини. В усіх варіантах використання деконтамінатів нижча ефективність стерилізації була в сорту Інгер. Контроль та всі інші варіанти, за виключенням варіанту із застосуванням РРМ™, були, на нашу думку, технологічно не прийнятними.

За нашими даними, на ефективність застосування згаданого препарату впливає положення експлантів в культуральній ємності (рис. 1.6). Використовувалися бруньки у фазі «зелений конус». Якщо вони були не повністю занурені в середовище, то їхня частина, поверхня експланта чи оточуюча його поверхня середовища інфікувалася. Лише за повного занурення рослинного матеріалу в дезінфікуючий розчин можна досягнути його деконтамінації. Згодом із експлантів відросли регенеранти без ознак контамінування.

Досліджено також вплив на ефективність деконтамінації тривалості культивування експлантів на живильному середовищі з 2 мл/л РРМ™ (табл. 1.5). У кожному варіанті висаджували по 100 експлантів ожини сорту Рубен та фундука сорту Барселонський. За коротких періодів культивування: (5 і 10 днів), відмічені значні відхилення в рості й розвитку пробіркових рослин перед подальшою пересадкою на середовище без РРМ™. Зокрема, за п'ятиденного культивування відхилення становили 81% у ожини та 89% у фундука за кількості живих експлантів 97 і 92 % відповідно. Під час тривалого періоду культивування на середовищі з біоцидом збільшувалася кількість стерильних експлантів, однак зменшувалася кількість живих. Візуально токсичний прояв тривалого періоду культивування на середовищі з РРМ™ був таким: поява фенолоподібних виділень навколо поверхні експлантата, відмирання точок росту, в'янення поверхневих покривів, хлорози, які з часом переходили в некрози.

Таблиця 1.4

Ефективність застосування деконтаміантів у процесі стерилізації експлантів верби додатково до гіпохлориту натрію

Варіант	Спосіб застосування	Ефективність стерилізації (%) за видами рослин верби	
		відселектований	природний
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
Біоцид РРМ™	Додавання в живильне середовище	90±5	96±4

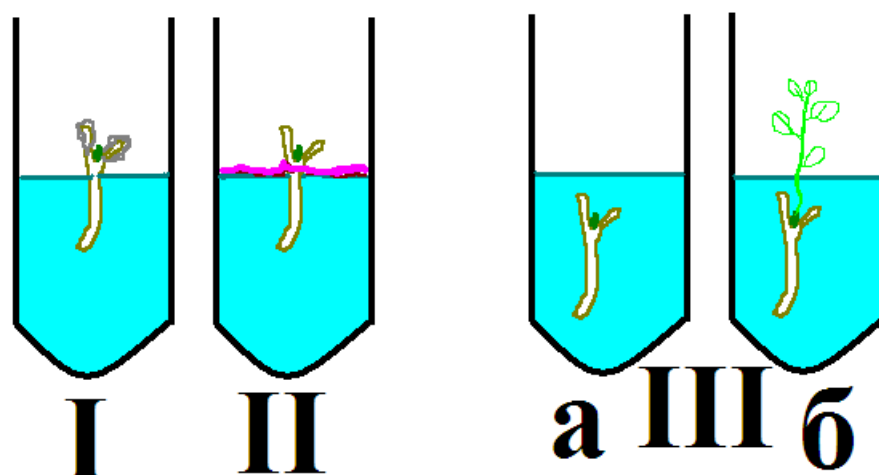


Рис. 1.6. Вплив положення експланта на ефективність РРМ™ доданого в живильне середовище, де: **I** – інфікування експланта мікроорганізмами; **II** – інфікування поверхні середовища мікроорганізмами; **III** – асептичний експлант за повного занурення в живильне середовище: **а** – невдовзі після садіння; **б** – через 15-25 днів культивування.

Таким чином, для ожини (сорт Рубен) та фундука (сорт Барселонський) оптимальними є періоди первинного культивування в 20 і 25 діб.

Таблиця 1.5

Вплив тривалості культивування експлантів на живильному середовищі з РРМ™ в концентрації 2 мл/л

Тривалість культивування, діб	Живих, шт.		Із рецидивами 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 із повним зануренням у середовище із РРМ™ нами досліджено вплив концентрацій цієї речовини на ефективність деконтамінації рослинних об'єктів, що належать до різних ботанічних видів та життєвих форм (табл. 1.6).

Таблиця 1.6

Вплив концентрації РРМ™ на ефективність деконтамінації експлантів різних видів рослин на 20 день культивування, %

Життєва форма	Вид рослини	Стан експланта	Концентрація РРМ™ в середовищі, мл/л						НІР ₀₅
			0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	
Трав'янисті	Цмин італійський	стерильних	13	19	74	94	100	10 0	6
		живих	13	18	71	90	63	18	5
	Міскантус гігантський	стерильних	1	8	65	88	97	10 0	7
		живих	1	7	61	80	65	19	4
Чагарникові	Троянда, сорт "Авеланж"	стерильних	-	3	29	36	93	10 0	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	10 0	5
		живих	-	2	7	36	90	64	4
	Фундук, сорт Барселонський	стерильних	-	-	1	24	87	92	
		Живих	-	-	1	20	68	52	

Встановлено низьку ефективність концентрацій препарату 0,5 і 1,0 мл/л. За концентрації 0,5 мл/л в чагарникових (троянда, ожина) та деревинних (вишня, фундук) не було стерильних експлантів. Дуже мала їх частка спостерігалася у трав'янистих рослин: цмину і міскантусу відповідно 13 і 1%. За концентрації препарату 1,0 мл/л частка стерильних експлантів була у трав'янистих цмину і міскантусу, відповідно, 19 і 8%, а в троянди та ожини і вишні, відповідно, 3 і 2%. Не виявлено стерильних форм за згаданої концентрації РРМ™ у фундука.

Збільшення концентрацій РРМ™ в живильному середовищі підвищувало ефективність деконтамінації, але серед стерильних експлантів часто зменшувалася кількість живих. Для двох видів трав'янистих рослин оптимальною була концентрація 2,0 мл/л. У цьому варіанті середовища в цмину італійського до загальної кількості висаджених виявилось 94 % стерильних експлантів і 90 % живих. За збільшення концентрації препарату до 2,5 мл/л показник «стерильність» становив 100%, але живих було лише 63 %. Подальше збільшення концентрації препарату до 3,0 мл/л призводило до зменшення кількості живих експлантів, що становило лише 18%. Подібна залежність виявлена і для міскантусу гігантського.

Іншою виявилася оптимальна концентрація препарату для згаданих видів чагарникових і деревинних рослин. Концентрація його в 2 мл/л для них виявилася малоєфективною. Кількість деконтамінованих експлантів була від 24% у фундука до 36% у троянди. Оптимальною для згаданих життєвих форм була концентрація в 2,5 мл/л. Вихід стерильних експлантів становив від 96% у вишні до 84% у ожини. Кількість живих експлантів відповідно становила від 91% у троянди до 68% у фундука.

Слід також вказати на вплив біологічних особливостей видів рослин на ефективність деконтамінації. Серед досліджуваних об'єктів найвищою вона була в експлантів цмину італійського, а найнижчою – у фундука.

У цілому, препарат РРМ™ для всіх культур, які використані в дослідженні, виявив 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. Однак, якщо рахувати затрати, які в разі зростають у випадку низької ефективності інших деконтамінантів, оплату праці, електроенергію і т.п. та втрата технологічного часу на повторне обеззаражування, цей біоцид доцільно застосовувати як додатковий деконтамінант для зменшення загального інфекційного фону після обробки гіпохлоритом натрію.

Одна з негативних сторін використання препарату РРМ™ – гіпоксія у експлантів, які тривалий час (2-3 тижня) знаходяться заглибленими в штучне живильне середовище.

Для стерилізації насіння та вегетативних органів винограду розроблено спосіб із застосуванням гідроксихлориду алюмінію, який одночасно діє як антисептик і антикоагулянт [56].

Всі згадані вище речовини є хімічними стерилізаторами. Водночас, відпрацьовуються **фізичні методи деконтамінації** рослинного матеріалу, зокрема, розроблений М.Е. Ламберовою та співавторами [79], основу якого складає іонізуюче опромінення. Стерилізацію експлантів проводять у дистильованій воді дією ультразвукових коливань з інтенсивністю 1-2 Вт/см² на робочій частоті 22-44 кГц впродовж 3-6 хвилин. Деконтамінація відбувається за рахунок формування й закривання у водному середовищі кавітаційних пухирців на поверхні експлантів [163]. За таких умов відбувається руйнування патогенних форм без використання хімічних речовин.

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

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

1.2.4. Особливості введення *in vitro* *Agapanthus*

Порівняно із згаданими вище об'єктами, зовсім інший вплив левоміцетину та гентаміцину сульфату встановлено за деконтамінації експлантів видів рослин роду агапантус: агапантус африканський (*Agapanthus umbellatus*, сорт *Charlotte*) та агапантус ранній (*Agapanthus praecox*, сорт *Black magic*). Це цінні декоративні рослини, проте широке розповсюдження їх стримується повільним розмноженням. За його вегетативного способу розмноження коефіцієнт становить близько 1:5 з повторним діленням через 4-5 років, а за насінневого розмноження рослини зацвітають на 5-7 рік. Крім цього, серед отриманого матеріалу не зберігається генетична стабільність [227]. Тому для швидкого комерційного розмноження цієї культури використовують біотехнологічний метод [78, 196]. Однак, стримуючим фактором введення в асептичну культуру нових сортів культур є глибоке контамінування експлантів грибною та бактеріальною мікрофлорою. Застосування гіпохлориту для поверхневої стерилізації не дало бажаних результатів. Це пов'язано з тим, що високі концентрації або тривалі експозиції препарату призводять до токсикації рослинних тканин. За зменшення дії стерилізуючого агента збільшується відсоток інфікованих експлантів, що потребує повторної їх обробки, а це не завжди дозволяє зберегти матеріал [196]. Тому, для стерилізації експлантів рослин агапантусу нами випробувано різні схеми застосування препаратів: гіпохлорит натрію (комерційний препарат "Білизна") і стерилізуючих агентів системної дії (антибіотики та фунгіциди).

На ефективність деконтамінації експлантів *Agapanthus umbellatus* сорту *Charlotte* впливало місце ізоляції їх із донорської рослини *in vivo* (рис. 1.7, табл. 1.7). Найнижчою величиною деконтамінації (1%), була за використання пазушних бруньок, розміщених на підземному кореневищі. У цьому випадку більшість інфекції проявлялася вже на 10 день культивування, а на 30 день вільними від контамінантів залишився лише один експлант із 100 ізольованих.

Порівняно вища ефективність стерилізації виявлена за використання в якості експлантів квіток. Однак, в подальшому з них отримувати адвентивні бруньки складніше й потрібно більше часу. Поряд з цим, у близьких до агапантусу цибулі й часнику ефективними експлантатами виявили тканини суцвіття [78]. Доведено, що для експлантів лілій [115] та тюльпанів [5] найбільшим морфогенетичним потенціалом наділені квітколоже, на основі якого є меристематичні зони. Вони в культурі *in vitro* формують пагони [192]. Оптимальним періодом введення їх у асептичні умови є мікроспорогенез і утворення одноядерного пилку. У цей час обгортки суцвіття закриті, пиляки зелені, що і обумовлює успіх роботи. Пізніше на стадії двоядерного пилку, за розкритої обгортки і жовтих пиляків, отримати регенеранти не вдавалося.

Походження первинних експлантів впливало на утворення рослин-регенерантів. Із основи суцвіття формувалося по одній великій рослині, тоді як з квітки хоча і за довший період, формувалася більша кількість регенерантів, але менших розмірів. Сам експлант від розростання його сегментів розпадався на шматки. Частина з них мала типові для цього виду листки, а частина – квіткові пелюстки, оцвітини зеленого кольору. За подальших ділень частина такої оцвітини утворювала нові видозмінені квітки, а частина регенерувала мікророслини із листками.

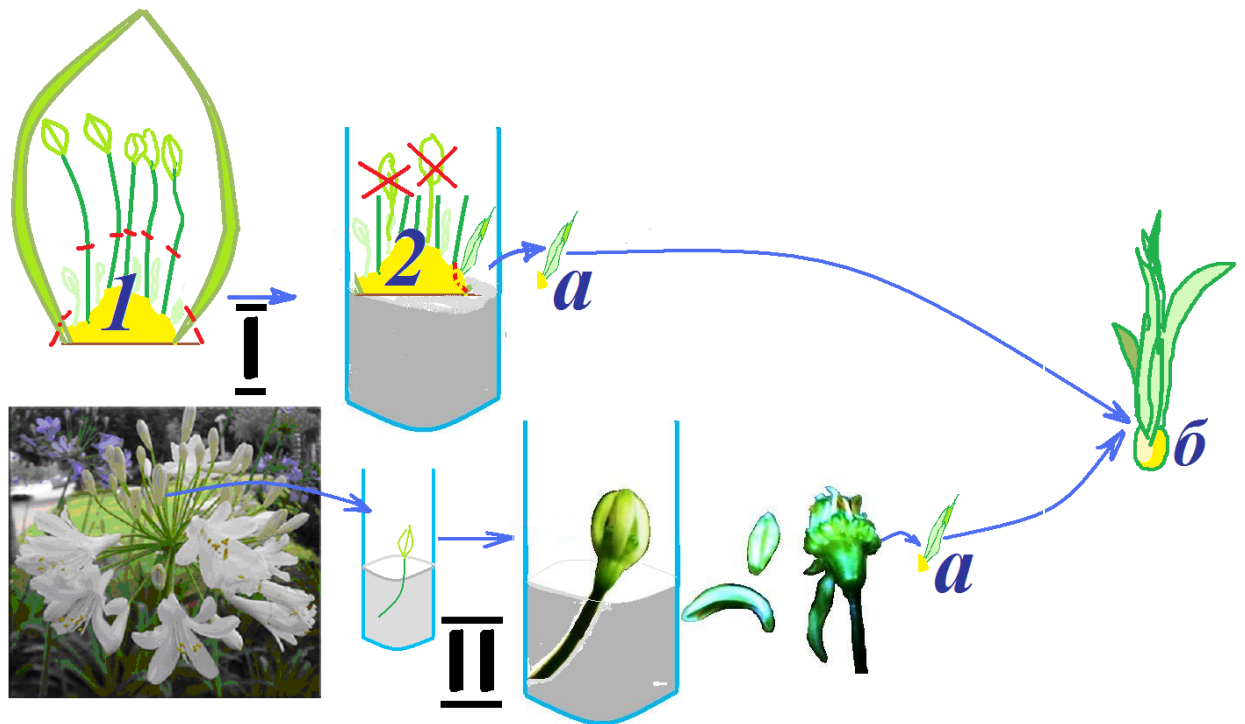


Рис. 1.7. Схема отримання регенерантів *Agapanthus umbellatus* із експлантів ізольованих з основи суцвіття (I) та з квітки (II):

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

Таблиця 1.7

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

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

Застосування нами таких експлантів під час введення в культуру *in vitro* агапантусу сорту *Charlotte* дозволило отримати 53% життєздатних експлантів, а ефективність деконтамінації становила 15%. У подальшому цей метод удосконалено за результатами випробування ефективності інших деконтаміантів, які застосовувалися на фоні суміші гіпохлориту натрію та перманганату калію (табл. 1.8).

Таблиця 1.8

Вплив сумісного застосування гіпохлориту натрію, антибіотиків і фунгіцидів на деконтамінацію експлантів (основа суцвіття) *Agapanthus* сортів *Charlotte*, *Black magic*

Тип експланта	Живих експлантів, %		Ефективність деконтамінації, %		Початок утворення адвентивних бруньок, днів		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 (<i>Chloramphenicol</i>)	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
Беноміл (фундазол)	62,1	67,3	15,3	19,6	71,0	67,6	1,9	5,5
Превікур Енерджи 840 SL, в.р.к. – Bayer Garden	71,5	73,9	40,2	47,6	27,4	21,4	24,3	28,8
Максим Форте 050 FS т.к.с. – Syngenta	70,1	68,6	38,3	41,6	61,8	59,7	9,3	7,2
НІР ₀₅	3,3	4,0	1,6	2,8	-	-	2,6	0,9

Незважаючи на ефективність застосування антибіотиків для деконтамінації експлантів хости [97], їхня дія не проявилася у випадку з *Agapanthus*. Окрім цього, використання левоміцитину, порівняно з контролем (без додаткових деконтаміантів – лише суміш гіпохлориду натрію і перманганату калію), вповільнювало утворення та зменшувало кількість адвентивних бруньок на 3,2-1,1% у сорту *Charlotte* та 7,1-3,8%, у сорту *Black magic*. Причина цього – ймовірно контамінування експлантів не тільки бактеріями, але й грибами. Підтвердженням викладеного може бути наявність грибної інфекції в ендоспермі *Castanea sativa* Mill [117].

Ефективність застосування як додаткового деконтамінанта фунгіциду Фундазол (беноміл) істотно не відрізнялося від контролю. Варіант із застосуванням Превікур Енерджі 840 SL переважав як контроль, так і решту варіантів за усіма досліджуваними показниками, які досліджували. Зокрема, в сорту *Charlotte* виживання експлантів, порівняно з контролем, зросло із 52,1 до 71,5%, а деконтамінація збільшилася з 14,2 до 40,8%. У цьому варіанті зменшився період, необхідний для утворення в експлантів адвентивних вегетативних бруньок, які відокремлювалися за наступних субкультивувань і утворювали мікророслини, а також відмічено збільшення виходу регенерантів з експлантів із 3,2% у контролі до 24,3.

Препарат Максим Форте 050 FS переважав контроль за всіма показниками, але поступався варіанту із використанням Превікур Енерджі 840 SL.

Отже, збільшення відсотку живих експлантів після стерилізації фунгіцидом Превікур Енерджі 840 SL, скорочення періоду, необхідного для утворення адвентивних бруньок, а також збільшення виходу регенерантів свідчить не лише про деконтамінуючий вплив його на експланти (фунгіцидна дія препаратів), але й стимулюючий ефект на регенераційний процес.

1.2.5. Вплив виду експлантів на ефективність деконтамінації та морфогенез рослин за МКРР

Перед початком МКРР велику увагу слід приділяти відбору маточних рослин, які мають бути типовими для цього ботанічного виду, сорту (форми) і без ознак захворювання. У цей період також вживаються заходи щодо зниження рівня інфікованості рослин – донорів експлантів.

На ефективність введення в асептичні умови та проходження регенераційних процесів значною мірою впливає вид експланта [78]. Нами встановлено вплив цього фактору на успішність деконтамінації та перших асептичних культивувань у наступних видів рослин: туя західна, хоста, кактус, агапантус. Зокрема, для оптимізації технології МКР туї західної за ефективністю деконтамінації порівнювалися такі види експлантів ізольованих у 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. 1.9).

За першого асептичного культивування встановили, що вид експланта впливає на контамінування регенерантів. Найбільша кількість інфікованих об'єктів виявлена за введення *in vitro* стеблових живців. Це може бути результатом глибокого проникнення контамінуючих агентів у тканини експлантів. Використання насіння зменшувало, порівняно із живцями, контамінування з 82,3 до 67,8%. Серед досліджуваних експлантів видів найбільша кількість асептичних отримана за використання пагонів проростків.

У представників родини кактусових (*Astrophyllum ma Sclerocactus*) на морфогенез та контамінацію експлантів також впливали їх біологічні особливості (табл. 1.10). Високий відсоток контамінування *Astrophyllum myriostigma v. monstrosa* cv. *Lotus Land*, на нашу думку, пов'язаний із значною його опушеністю. Експлантам цього виду властивий більший, порівняно із видом *Sclerocactus*, відсоток загиблих та менша кількість морфогенних.

У хости ефективність стерилізації також значною мірою залежала від виду експлантів. Наприклад, у випадку використання пазушних підземних бруньок дослідники мали проблеми із їх грибним та бактеріальним контамінуванням [202, 215].

Таблиця 1.9

Вплив виду експланта на ефективність введення в асептичні умови *Thuja occidentalis* сорту *Smaragd*

Тип експланта	Контаміновано, %	± до контролю
меристема (контроль)	9,3	-
стебловий живець	82,3	+73,0
насіння	67,8	+58,5
пагін проростка	7,2	- 2,1
НІР ₀₅	3,1	-

Таблиця 1.10

Вплив виду кактусів на контамінування і морфогенну активність первинних експлантів (фотоперіод 12 годин)

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

За результатами (табл. 1.11), порівняння ефективності використання таких бруньок і бутонів нами було встановлено наступне. У чотирьох сортів за кількістю стерильних експлантів переважали ізольовані з бутонів. Проте, у сортів Гіацинтіана та Агалон виявлені соматкони, які відрізнялися за забарвленням листків.

Таблиця 1.11

Кількість стерильних експлантів хости та соматклонів залежно від сорту та типу експланта

Характеристика матеріалу	Сорт							
	Патріот		Гіацинтіана		Халціон		Агалон	
	брунька	бутон	брунька	бутон	брунька	бутон	брунька	бутон
Виділено експлантів, шт.	86	24	57	18	51	23	93	16
Контаміновано, шт.	53	21	33	11	36	19	59	13
Соматклонів, шт.	-	-	-	1	-	-	-	3

Ефективність введення експлантів у асептичні умови залежить від вирощування рослин, з яких їх ізолювали. Нами встановлено вплив походження рослин-донорів виду *Agapanthus umbellatus* на звільнення експлантів від контамінації (табл. 1.12). Із рослин сорту *Charlotte*, які тривалий час росли в нативних умовах, квітували та розмножувалися вегетативно, отримано експланти з нижчим рівнем деконтамінації, ніж від рослин, які виростили із насіння і вперше утворили бутони. Це дозволяє припустити, що тривале вегетативне розмноження в звичайних умовах підвищує контамінацію садивного матеріалу мікроорганізмами.

Таблиця 1.12

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

Рослини донори	Живих експлантів, %	Інфікованих, %		Ефективність деконтамінації, %
		на 10 день	на 30 день	
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

1.3. Середовища для регенерації рослин із меристем

Незважаючи на постійне вдосконалення штучних живильних середовищ для рослин *in vitro*, вони за своїм складом лише невеликою мірою можуть наблизитися до наявних у нативних умовах.

Для отримання рослин із меристем найчастіше використовуються експланти конусів наростання пагона. Ця технологія знайшла широке застосування для вирішення таких практичних завдань як введення рослин в асептичні умови нерідко з використанням додаткових методів, зокрема одночасного звільнення рослин від вірусів. У фізіології та біохімії апікальних меристем рослин *in vitro* переважно виконуються дослідження із морфогенезу, зокрема для вивчення фізіології переходу меристеми з вегетативного в генеративний стан. В умовах культури, верхівкову меристему розглядають як систему, на яку мають безпосередній вплив зовнішні умови (температура, фотоперіод, освітлення різної інтенсивності й складу), а також внутрішні стимули (гормони, трофічні речовини), які обумовлюють перехід до цвітіння [56].

Метод культури меристем успішно використовується для прискореного й масового розмноження сільськогосподарських, лісових та декоративних рослин. Однією з перших культур, меристеми якої промислово почали вводити в асептичні умови й оздоровлювати від вірусів, була картопля. Ці дослідження давно вийшли за межі наукових лабораторій і масово використовуються в промисловому виробництві.

Відтворення рослин картоплі з меристематичної тканини досить складний і тривалий процес, що вимагає оптимальних контрольованих умов росту та розвитку. Застосування середовища із збалансованим умістом штучних біологічно-активних речовин, які замінюють природні, дозволяє покращити проходження життєвих процесів на етапах від експлантів до мікророслин.

Із метою підбору оптимального середовища для регенерації рослин з меристем, нами було порівняно типи живильних середовищ з мінеральною основою за прописом Мурасіге і Скуга, які відрізнялися між собою складом біологічно-активних речовин (табл. 1.13).

Встановлено, що оптимальним серед досліджуваних середовищ для культивування меристем сортів картоплі “Світанок ківський” та “Кобза” був варіант M2(1), оскільки в ньому відмічено порівняно високе приживлення меристем за задовільного відсотку регенерації (табл. 1.14).

Таблиця 1.13

Відмінність модифікованих середовищ Мурасіге і Скуга за вмістом БАР

Позначення середовищ	БАР та їх концентрація
M2(1)	Аденін – 0,25 мг/л, кінетин – 0,25 мг/л, ІОК – 0,5 мг/л
M2(2)	Аденін – 10,0 мг/л, гіберелін – 1 мг/л
M2(3)	Гібберелін – 1 мг/л
M2(4)	Аденін – 20,0 мг/л, гіберелін – 1 мг/л

Таблиця 1.14

Ефективність регенерації рослин із ізольованих меристем картоплі *in vitro* залежно від умісту БАР

Середовище	Прижилося меристем, %	Рослин-регенерантів з висаджених меристем, %
Сорт ‘Світанок ківський’		
M2(1)	72,4	37,9
M2(2)	75,0	3,4
M2(3)	90,9	0,0
M2(4)	64,0	12,0
Сорт “Кобза”		
M2(1)	85,0	65,0
M2(2)	60,2	29,2
M2(3)	71,4	14,3
M2(4)	26,7	6,7

Водночас застосування цього варіанту не вирішувало проблему низького відсотку отримання регенерантів. Тому оздоровлюючи нові сорти Серпанок і Фантазія, було випробувано препарат ДГ-75 (табл. 1.15), що є похідним тетрагідротіофендіоксиду. Він має потрійну активність: цитокінінову, ауксинову і гіберелінову.

Меристеми виділяли за прийнятою методикою. Контролем було вище згадане середовище M2(1), а препарат ДГ-75 випробовували в концентраціях 1 мг/л, 3 мг/л і 5 мг/л.

За регенерації з меристем період до настання морфогенезу у контролі був найкоротшим у сорту “Серпанок” – 22 дні, а в сорту “Фантазія” – 27 днів. Найвищий вихід регенерантів виявився у варіанті із застосуванням ДГ - 75 у дозі 1 мг/л. Для сорту “Серпанок” це становило 100%, а сорту “Фантазія” – 97%. Більші концентрації ДГ - 75 подовжували період регенерації меристем та знижували їх вихід до 68-80% залежно від біологічних особливостей сорту.

Таблиця 1.15

Вплив регулятора росту рослин ДГ-75 на регенерацію меристемних експлантантів

Варіант	Кількість днів до настання морфогенезу	Вихід регенерантів, %
Сорт “Серпанок”		
контроль – M2(1)	22,4	95
M2(1) + ДГ-75*, 1 мг/л	29,2	100
M2(1) + ДГ-75, 3 мг/л	35,6	80
M2(1) + ДГ-75, 5 мг/л	47,2	78
HP ₀₅	3,1	4,2
S \bar{x} , %	1,02	3,5
Сорт “Фантазія”		
контроль M2(1)	26,7	85
M2(1) + ДГ-75, 1 мг/л	32,9	97
M2 (1)+ ДГ-75, 3 мг/л	39,9	75
M2 (1)+ ДГ-75, 5 мг/л	46,2	68
HP ₀₅	5,3	3,8
S \bar{x} , %	3,3	4,0

* препарат Д-75 синтезований доцентом П. Г. Дульновим у НДЦ «АСКО» Інституту біоорганічної хімії і нафтохімії НАНУ

Отримані дані в 2000 році підтверджено в 2001 році на сортах Повінь і Веста (табл. 1.16).

Таблиця 1.16

Вплив препарату ДГ-75 на регенерацію рослин з меристемних експлантів

Варіант	Швидкість морфогенезу, діб	Не прижилося експлантантів, %	Отримано, %	
			калюсів	мікророслин
Сорт “Повінь”				
контроль	21	2	10	88
M2(I) + ДГ - 75, 1 мг/л	29	3	1	96
Сорт “Веста”				
Контроль	20	19	7	74
M2(I) + ДГ - 75, 1 мг/л	32	9	0	91
HP ₀₅	4,6	3,9	3,2	2,3
S \bar{x} , %	5,5	4,7	4,1	1,1

Окрім меристем проводили випробовування препарату ДГ-75 на живцях сортів “Серпанок” (табл. 1.17) і “Фантазія” (табл. 1.18). Для цього вирощені регенеранти живцювали на середовищі Мурасіге і Скуга за прописом Інституту картоплярства з додаванням ДГ-75 у тих же концентраціях, що і в досліді з меристемами.

Таблиця 1.17

Вплив препарату ДГ-75 на ріст регенерантів із живців картоплі *in vitro*, сорт “Серпанок”

Варіант	Вік рослин, днів	Висота, мм	Кількість живців, шт.	Довжина живця, мм
*Ні – контроль	7	19,9	2,5	8,0
	14	68,2	4,4	15,5
	21	104,3	6,5	16,0
Ні + ДГ-75, 1 мг/л	7	33,9	2,1	17,0
	14	80,4	3,1	19,6
	21	106,9	4,1	17,5
Ні + ДГ-75, 3 мг/л	7	16,4	2,1	7,8
	14	31,5	3,1	10,2
	21	106,9	4,1	12,2
Ні+ДГ-75, 5 мг/л	7	15,2	2,1	7,2
	14	29,1	3,0	9,7
	21	57,4	4,2	13,7

*середовище Мурасіге і Скуга в модифікації Д.П. Остапенка (Інститут картоплярства НААНУ).

Таблиця 1.18

Вплив препарату ДГ-75 на ріст регенерантів із живців картоплі *in vitro*, сорт “Фантазія”

Варіант	Вік рослин, днів	Висота, мм	Кількість живців, шт.	Довжина живця, мм
Ні (1) - контроль	7	14,3	2,5	5,7
	14	30,7	4,0	7,7
	21	53,1	6,7	7,9
Ні + ДГ-75, 1 мг/л	7	23,9	2,0	12,0
	14	40,6	4,0	9,9
	21	67,1	6,0	11,2
Ні + ДГ-75, 3 мг/л	7	10,3	1,9	5,4
	14	23,7	2,5	9,5
	21	40,6	4,1	9,9
Ні + ДГ-75, 5 мг/л	7	13,2	1,9	6,9
	14	23,6	2,9	8,1
	21	39,9	4,1	9,7

Встановлено, що ДГ-75 посилює ріст рослин. Після трьох тижнів культивування рослини сорту “Серпанок” у варіантах із концентрацією препарату 1 мг/л їх висота становила 107 мм, що на 2,6% більше, ніж у контролі, а в сорту “Фантазія” – 103 мм, тобто на 94 % вище контролю. Однак коефіцієнт розмноження в цьому варіанті зменшувався: у контролі було 6,5-6,7 живця, залежно від сорту, а в досліджуваному варіанті – 4,1 - 6,0. При додаванні в середовище 1 мг/л ДГ-75 видовжуються міжвузля рослин сорту “Фантазія”, який характеризується вкороченими міжвузлями. Тому, вважаємо доцільним застосовувати препарат для технології живцювання сортів із вкороченими міжвузлями *in vitro*.

Отже, оптимальним для регенерації меристем сортів “Кобза” та “Світанок київський” виявилось середовище М2(1), а заміна в ньому фізіологічно активних речовин на 1 мг/л ДГ-75 дозволяє уникнути використання відразу трьох недешевих регуляторів росту: а) аденін в концентрації 0,25 мг/л; в) кінетин в концентрації 0,25 мг/л та г) ІОК у концентрації 1 мг/л.

1.4. Утворення регенерантами фенолоподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від умов та виду рослин

Загальною проблемою для більшості видів рослин при переведенні з умов *in vivo* в *in vitro* є фенольна інтоксикація експлантів. Після введення в культуру експланти виділяють у середовище продукти вторинного обміну, які потім пригнічують їхній ріст та розвиток. Це особливо актуально для таких деревних видів, як дуб та горіх [178]. Фенольні сполуки є одними із найбільш поширених вторинних метаболітів у тканинах вищих рослин. Їх синтез зберігається й за культивування клітин та тканин в умовах *in vitro*. Встановлено, що зростання рівня диференціації клітин супроводжується збільшенням їх здатності до утворення поліфенолів. Так в мікропагонах рослин-регенерантів, що знаходилися 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 та зоні провідних пучків [68].

Дані окремих дослідників щодо впливу фенольних сполук на процеси ризогенезу неоднозначні. Одні з них [56, 78, 146] вважають, що під час ризогенезу фенольні речовини відіграють другорядну роль порівняно з фітогормонами, але вони здатні змінювати рівень ауксинів, виступаючи протекторами чи активаторами процесів їхнього окиснення. У модельних дослідах показано, що моногідроксильні феноли, руйнуючи ауксин, виступають коферментом ауксиноксидази і в такий спосіб гальмують ріст рослин. За даними ряду дослідників [58, 112, 146] дигідроксильні феноли, навпаки, виявляють інгібуючу дію на ауксиноксидазу і стимулюють ростові процеси.

Наприклад, первинне культивування експлантів скумпії, дуба і церсису ускладнене активним синтезом, накопиченням та виділенням в живильне середовище речовин фенольної природи, що через 2-3 тижні призвело до масової загибелі культур [6]. Їх утворення пов'язане з тим, що під час культивування мікроживцюванням *in vitro* у багатьох рослин, особливо деревних та чагарникових порід, часто внаслідок механічного пошкодження в процесі ізолювання експлантів (травмування під час живцювання) спостерігається виділення фенольних сполук в живильне середовище. Вони набувають вигляду темно-коричневих плям. Відомо, що синтез фенольних сполук, негативно впливаючи на клітинну проліферацію, не лише зменшує ефективність засвоєння регенерантами азоту [56], але й знижуючи ризогенез [159]. Ці сполуки виділяються рослиною у відповідь на стресову ситуацію, наприклад, внаслідок травмування або дії фітовірусної інфекції [124]. Спостерігається також вихід фенолів з вакуолей у плазму та їх окислення локалізованими там ферментами з утворенням ріст інгібуючих продуктів [76]. Вплив фенолів та інших подібних речовин обумовлює зменшення регенераційного потенціалу за тривалого субкультивування [56, 78, 159].

Вирішення проблеми самоотруєння *in vitro* фенолами можливе через додавання в живильне середовище різних речовин, наприклад, збільшення концентрації гліцину за вирощування *in vitro* рідкісних видів орхідних флори Криму [131]. Встановлено, що в період активного росту проростків орхідних відбувається виділення в живильне середовище значної кількості фенольних сполук, які уповільнювали їх ріст. Причому виділення фенолів відмічалось лише у видів, схильних до їх утворення в процесі культивування експлантів дорослих нативних рослин. Це види, які зростають на відкритих просторах: узліссі та світлих схилах, а саме: *Ophrys oestriifera*, *Anacamptis pyramidalis*, *Himantoglossum caprinum*. Певно, таку здатність ці орхідні набули в процесі еволюційних пристосувань та алелопатичних взаємовідносин рослин в фітоценозі.

Склад живильного середовища, яке використовується для регенерації рослин *Cymbidium Sw*, модифікований у відділі біотехнології Нікітського ботанічного саду, для видів, що інтенсивно виділяють феноли. Запропоновано застосовувати підвищені концентрації гліцину (50,6-63,2 мкМ) як за культивування проростків, так і органів природних рослин. Найкраще коренеутворення відмічене з використанням ІМК і НОК в концентрації 2,46 мкМ та 2,69 мкМ відповідно.

Щоб нейтралізувати виділені феноли рекомендують [78] додавати в середовище активоване вугілля (1-2 г/л), адсорбційні властивості якого сприяють рівномірному розподілу елементів живлення в середовищі та видаленню продуктів метаболізму. Також ефективним було додавання в середовище під час перших культивувань смородини чорної лимонної та аскорбінової кислот [22].

Поширеним на практиці є часте пересаджування експлантів [78]. Наприклад, для малини пропонують проводити за перших субкультивувань пересаджування експлантів щотижня [63]. Стосовно горіха встановлено, що інтенсивне виділення фенольних речовин у живильне середовище спостерігалось у 8-35% експлантів, але часті пересадки (через 2-7 діб) дозволяли мінімізувати негативний вплив цього явища [151]. Тобто в кожного окремого виду рослин для усунення фенолоутворення експлантами застосовують різноманітні способи нейтралізації цих речовин і тим самим запобігають негативного їх впливу на ріст і розвиток матеріалу *in vitro*.

Для удосконалення методики первинного субкультивування експлантів *Thuja occidentalis* 'Smaragd', *Miscanthus giganteus*, *Scyrocaactus spinosior* досліджено природу утворення фенолоподібних речовин регенерантами під час перших пасажів. Зокрема, для оптимізації процесу тривалого МКР *Thuja occidentalis* 'Smaragd' нами встановлено вплив на фенолоутворення 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, отримані з однорічного приросту пагона, насіння, пагін проростка з двома хвоїнками, отримані з насіння на перлітному субстраті (табл. 1.19).

Таблиця 1.19

Вплив виду експлантів на регенерацію та виділення фенолоподібних речовин регенерантами *Thuja occidentalis* Smaragd за введення в асептичні умови

Тип експланта	Експлантів з фенольними виділеннями, %	Регенерантів що мали, %			Морфогенез відсутній, %
		коріння	пагони	коріння і пагони	
меристема	81,8	8,7	13,1	16,6	57,3
стебловий живець	95,4	1,4	0,6	0,9	14,8
насіння	14,9	2,6	11,1	14,6	3,9
пагін проростка	58,7	29,2	38,7	24,1	0,8
НІР ₀₅	7,7	0,4	0,3	0,3	0,5

Поява в середовищі фенольних плям залежала від виду експланта. Під час їх регенерації найбільша частка матеріалу *in vitro* з фенольними виділеннями виявлена в стеблових живців, а найменша – з використанням насіння, що ще раз підтверджує ранову природу виділення фенольних сполук у середовище [101]. Найбільший відсоток регенерантів з стеблом та кореневою системою отримано завдяки введенню в культуру пагонів проростків.

Згідно з даними окремих дослідників, індуктором утворення фенолів *in vitro* за живцювання (поранення рослин) є перевага цитокінінів над ауксинами [56], а тому нами в живильному середовищі замінено кінетин на аденін (табл. 1.20), що також має цитокінінову активність, але значно слабшу [73, 98].

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

Додавання лише аденіну (без кінетину) в кількості 20 мг/л дозволило збільшити вихід регенерантів, порівняно з контролем, із 71,2% до 89,5%. Серед них була більша кількість із розвинутим пагоном та коренем і зменшувалася до 24,9 % кількість регенерантів, що виділяли феноли в середовище.

Оскільки відомо, що аскорбінова кислота в рослинному організмі відновлює феноли до нетоксичних сполук [73], то в подальшій модифікації середовища окрім додавання аденіну, (20 мг/л) нами збільшена кількість аскорбінової кислоти із 1 мг/л до 15 мг/л. Це дозволило підвищити вихід регенерантів з експлантів і зменшити до 3,8 % кількість регенерантів із фенолоподібними виділеннями в середовище.

Появу фенолоподібних речовин можуть спричинити також тканини експлантів, що відмирають. Спостереження за МКР міскантусу свідчать про часте утворення в живильному середовищі навколо регенерантів темних плям, які згідно літературних даних обумовлюються впливом фенолоподібних сполук, що пригнічують розвиток рослин [78].

Таблиця 1.20

Вплив аденіну та кінетину на ефективність МКР *Thuja occidentalis* 'Smaragd'

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

*Примітка: в усіх варіантах, за винятком котролю і шостого, аскорбінову кислоту добавляли в кількості 1 мг/л

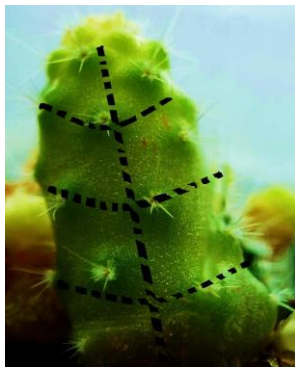
Для усунення цього явища випробувано ефективність видалення відмерлих листків із пагонів-експлантів (рис. 1.8, табл. 1.21). Це істотно збільшувало кількість пагонів у регенованих рослин з 1,40 до 2,18 шт., а також достовірно зменшувало (з 4,75 до 1,25%) кількість регенерантів, навколо яких утворювалися фенольні плями.

Окрім розглянутих вище чинників, що сприяють утворенню фенолів, впливає й величина ранової поверхні. Наприклад, за МКР *Sclerocactus spinosior ssp. Blainei* "schleseri" встановлено, що способи ізоляції експлантів впливали на регенерацію з них рослин та утворення фенольних плям у середовищі (рис. 1.9). За умови поділу стебла на шматки, де рана ділянка становила 1\2 всієї поверхні, навколо експланта утворювалися великі плями. Близько третини таких експлантів гинуло, а в інших відмічено інтенсивне калюсоутворення.

Експланти, отримані шляхом ізоляції бруньок, в яких рана поверхня становила лише близько 1/10 від усієї, за 5-6 тижнів утворювали розвинуті життєздатні пагони. Вони після перенесення на середовище з 1,0 мг/л ІМК формували кореневу систему і були готові до висаджування у відкритий ґрунт.



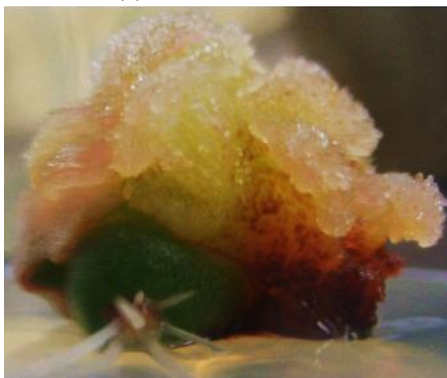
Рис. 1.8. Поділ рослини міскантусу на стеблові експланти: 1 – ціла вихідна рослина; 2 – обрізані експланти з видаленими відмерлими листками



Поділ на частини стебла



Поділ брунькуванням



Регенеранти з калюсом та фенольними виділеннями



Повноцінний регенерант придатний до укорінення

Рис. 1.9. Вплив способу ізоляції експлантів *Sclerocactus spinosior ssp. Blainei* "schleseri" на регенерацію з низ рослин

Таблиця 1.21

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	які прижились
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 ₀₅	2,1	0,07	0,11	3,3	0,9	3,6

Отже, для захисту від з фенольних виділень ефективним є: 1) правильний підбір первинних експлантів; 2) видалення старих тканин, що відмирають; 3) зміна живильного середовища шляхом збільшення концентрацій аскорбінової кислоти, гліцину, заміни на аденін або зменшення концентрацій цитокінінів та додавання активованого вугілля; 4) підбір шляхів ізоляції експлантів, що передбачало б значно меншу ранову поверхню.

1.5. Запобігання утворення фенольних сполук за введення *in vitro* горіхоплідних культур

Грецький горіх, фундук є складними культурами для введення *in vitro*, особливо внаслідок активного контамінування та самоотруєння фенолоподібними речовинами. Нами досліджено нові підходи до двох представників роду *Corylus* (ліщина ведмежа та два сорти фундука: Трапезунд та Сірена), які, на нашу думку, можуть вирішити проблему введення в культуру фундука стебловими експлантатами. Це заміна гіпохлориту натрію на РРМ^{MT} (Plant Preservative Mixture), часті субкультування, підготовка донорних рослин. Зміна технології деконтамінації шляхом додавання 2,5 мл РРМ^{MT} у живильне середовище без попередньої обробки гіпохлоритом натрію мали методичні складності. Зокрема, на живильне середовище висаджували нестерильний матеріал, який може контактувати як із інструментами (пінцети, ланцети і т. п.), так і культуральними ємностями.

Це спричинювало появу контамінуючих агентів у пробірках, які не контактували із біоцидами. Тому відсоток стерильних експлантів від прояву контамінантів у цьому варіанті досліду, порівняно із тим, що передбачав обробку експлантів NaClO та додавання у середовище РРМ^{MT}, зменшувався в сорту Трапезунд з 81 до 56, а в сорту Сірена з 87 до 63. Водночас зменшувалася кількість експлантів із опіками поверхневих тканин із 79% до 5% у сорту Сірена та з 67% до 9% у сорту Трапезунд. Також випробувано обробку експлантів на шейкері 50% розчином РРМ^{MT}. Проте, зміна лише підходу в деконтамінації не вирішувала проблему в цілому.

Експланти, які не мали опіків, утворювали фенолоподібні речовини, що локалізувалися переважно в тканинах експлантів і менше виділялися у живильне середовище. Живці, які виглядали ззовні зеленими, при розтині мали коричневі за забарвленням тканини внаслідок самоотруєння точки росту та листків, що прокривають меристемний купол (рис. 1.10).

Одним із поширених заходів попередження фенолоподібних утворень є застосування частих пересадок. Зокрема це дозволяє отримати морфогенні експланти троянди та грецького горіха. Нами проведено пересадку експлантів із наступними інтервалами: 5, 10 та 15 днів. Встановлено, що часті пересадки уповільнюють відмирання експлантів, проте на 45 день лише за умови частих пересадок (через 5 днів) вижило 5 % експлантів. Отже, пересадками неможливо вирішити проблему самоотруєння культури *in vitro* фенолоподібними речовинами. Для вивчення впливу на фенолоутворення віку рослин-донорів, нами випробувано експланти, ізольовані із рослин-донорів 2 і 18 років. Встановили, що з 18-річних рослин, за умови їхньої пересадки через 5, днів виживало у фундука сорту Трапезунд 4%, фундука сорту Сірена – 3% експлантів, а в ліщини ведмежої – жодного. У разі використання дворічних донорних рослин виживання експлантів, відповідно, зростало до 11, 7; 8,8 і 4,3%.

У процесі дослідження також випробували умови вирощування дворічних донорних рослин: а) у відкритому ґрунті; б) у теплиці. Експланти цих варіантів відрізнялися за приживанням, що, в першу чергу, залежало від самоотруєння фенолоподібним ексудатом. Перевага в усіх варіантах була при вирощуванні донорів у контрольованих умовах депозитарію. Наприклад, у сорту Трапезунд виживало 37,1% (з яких контаміновано 16,5% експлантів) ізольованих із маточних рослин, що росли у депозитарії. Із донорів, які росли у відкритому ґрунті, це становило відповідно 12,9 та 11,6%. Отже, для виділення експлантів рослини-донори доцільно вирощувати у контрольованих умовах закритого ґрунту (депозитарії), що забезпечить підвищення відсотку деконтамінації та зменшення фенолоутворення.

Отримані результати для фундука підтверджені в процесі введення в асептичні умови горіха грецького. Первинні експланти формували повноцінні листки та бруньки. В базальній частині фенольний ексудат був майже відсутнім. Незважаючи на те, що ранова поверхня мала коричневий колір (рис. 1.11), під нею формувався щільний зелений каллус.



Рис. 1.11. Базальна частина первинного експланта грецького горіха



Рис. 1.10. Виділення фенольного ексудату брунькою фундука

II. ОСОБЛИВОСТІ ОНТОГЕНЕЗУ РОСЛИН *IN VITRO*

Розвиток вищих рослин розподіляють на такі етапи: ембріональний, ювенільний (молодість), репродуктивний (зрілість і утворення насіння), сенильний (старість, відмирання).

Згідно з теорією М. П. Кренке, 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 [69].

Культура тканин, зокрема МКРР, крім процесів відновлення, які характерні для молодих частин рослин, є основою безвірусного насінництва багатьох сільськогосподарських культур. Отримані безвірусні лінії *in vitro* підтримуються шляхом вегетативного розмноження багато років [95]. Тому актуальним є пізнання природи старіння рослин та протилежне цьому явищу – збереження рослин в ювенільному стані або ювенілізація рослин.

2.1. Старіння і омолодження рослин та органів в онтогенезі

Старіння рослинного організму спричиняється як внутрішніми, так і зовнішніми факторами, але найбільш істотними є молекулярно-генетичні порушення та порушення відношень між окремими органами рослин. Водночас із 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, поступово виключається із синтетичних процесів, і загальний рівень метаболізму клітини гальмується [19].

Порушення в генетичному апараті спостерігаються упродовж усього життя організму, але в клітин молоді рослини відхилення від норми усуваються спеціальною репараційною системою клітин. З віком та під впливом несприятливих факторів активність цієї системи знижується і кількість генетичних відхилень у синтетичних процесах зростає. Цим спричиняється зростаюча дезорганізація процесів життєдіяльності, організм втрачає здатність до активного опору, старіє й відмирає. На старіння організму значний вплив мають порушення метаболічних відношень між окремими органами рослин: корінням і пагонами, листками і плодами, насінням, що формується, і листками, а також забезпеченістю рослин світлом, вологою, теплом, елементами мінерального живлення та їх співвідношенням [114].

Продовжує період вегетації надлишкове азотне живлення, а фосфорне прискорює дозрівання, отже і старіння рослин. Із зовнішніх факторів старіння прискорюється нестачею вологи та підвищеною температурою.

Регулюється цей процес і формуванням насіння. Коли, наприклад, у льону видалити квіти під час квітання, то рослини будуть вегетувати до пізньої осені, а якщо квіти залишити – то вегетація призупиняється і рослини відмиратимуть за дозрівання насіння наприкінці липня - початку серпня [19].

Згідно з основними положеннями теорії циклічного старіння та омолодження рослин [70], під час онтогенезу індивідуум неодмінно старіє і вмирає. Тривалість життя особини зумовлена еволюційними факторами, які можуть змінюватися під впливом зовнішніх умов. Старіння відбувається безперервно, але нерівномірно, зокрема як цілого організму, так і окремих його частин. За загального індивідуального старіння новоутворення 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. Інтенсивно старіють клітини за активного ділення.

Існує два поняття віку: власний вік частини рослини (строк від моменту її закладання до даного моменту) і загальний вік цієї ж частини рослини, який складається з її власного віку і віку рослини до моменту закладання цієї частини.

Останнім часом старіння розглядається як посилення з віком затухання 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 слід розглядати як посилення процесів життєдіяльності, пов'язаних з інтенсифікацією синтезу нуклеїнових кислот і білків, активацією ділення клітин та їх росту, виникненням й накопиченням ембріональних тканин, загальною активізацією фізіологічних функцій.

2.2. Особливості ювенільного етапу розвитку рослин

Ювенільний етап розвитку розпочинається з проростання насінини чи пробудження органів вегетативного розмноження (бульби, цибулини, бруньки тощо) і характеризується швидким нагромадженням вегетативної маси. На цьому етапі рослини не здатні до статевого розмноження. Тривалість його в різних видів не однакова: від кількох тижнів (у однорічників) до десятків років (кущі, дерева). Ювенільний стан підтримується в рослині специфічним співвідношенням фітогормонів [114].

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

На відміну від проростків, ювенільні рослини завдяки листкам та розвиненій кореневій системі є абсолютно самостійними у власному автотрофному живленні. Морфологічно вони найчастіше відрізняються від дорослих рослин своєрідністю листків, їхнім розміщенням. Ці відмінності ускладнюють їхню ідентифікацію.

Ювенільні рослини мають високу чутливість до навколишнього середовища і піддаються значному впливу його факторів. Крім цього, зміни, індуковані впливом навколишніх умов, накладають відбиток на проходження подальших етапів онтогенезу [114].

Морфологічна своєрідність ювенільних рослин проявляється в усіх органах. Часто це відмінності в будові, гілкуванні та їх відновленні. Первинні листки ювенільних рослин найчастіше відрізняються слабкою диференціацією та невеликою розчленованістю листкової 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 еспарцету [87] та в дерев із розсіченими листками, наприклад, грецький горіх, ясен [114]. У голонасінних видів первинні листки (хвоя) ювенільних рослин часто відрізняються від їх розвитку на пізніших етапах. У видів *Juniperus* із лускоподібною хвоєю: *J. sabina*, *J. twkestanica* проросткам притаманна голкоподібна хвоя, яка пізніше змінюється на лускоподібну. Це ж спостерігається у видів *Cupressus* та *Tuja*. У виду *Picea excelca* впродовж перших років життя на головних осях розвиваються хвоїнки сплюснуті із боків. Із віком хвоя набуває в перерізі квадратної форми, і рештою стає значною мірою сплюснутою в дорзовентральному напрямку. Одночасно збільшується кількість рядів продихів на гранях хвої [114].

Будь-який показник – морфологічний, анатомічний або фізіологічний – характеризується помітною тенденцією вікових змін. Наприклад, листки мають можливість змінюватися від черешкових до сидячих, від менш розсічених до більш розчленованих, від меншого вмісту хлорофілу до зростання його кількості і т.п. Кренке Н.П [69] простежив зміни в молодих рослинах. Наприклад, у розсади капусти він виділив такий показник, як довжина черешка. У процесі 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 скоростиглими, а екземпляри, в яких даний показник змінюється повільніше, виявляються більш пізньостиглими [69, 70, 144].

Отже, ювенільний стан рослин впливає на подальші етапи їх розвитку, а тому дослідження, пов'язані з цим етапом, є актуальними для насінництва та фізіології рослин.

2.3. 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 онтогенетично більш старий матеріал вводиться в культуру *in vitro* складніше [87, 89].

Прояв ювенільності та старіння викликають цілий ряд дискусій хоча б тому, що їхні строки є чітко невизначеними. Одним з показників старіння можна вважати втрату здатності до вкорінення. Це властиво багатьом рослинам, що досягли зрілого віку, а тому дослідження з цього погляду актуальні для всіх способів вегетативного розмноження, в тому числі й мікроклонування. Іноді перед введенням у культуру рослини реювенілізують шляхом щеплення живців старих дерев на 2-3-річні сіянці або використовуються мікрощеплення *in vitro* [188].

Водночас, досить багато дослідників однією з переваг МКРР вважають здатність до реювенілізації матеріалу в культурі *in vitro*. Gupta P.K. зі співавторами [193] зясували, що нездатні до вкорінення експланти, отримані з 20-річних дерев, після трьох пересадок виявили здатність до ризогенезу і з кожним новим пасажем вкорінення відбувалося успішніше. Досить часто в рослин, що перебували в культурі *in vitro* впродовж 1-2 років, спостерігали спонтанний ризогенез [189].

Здатність до реювенілізації доведено на морфологічному та біохімічному рівнях. У процесі вивчення біохімічних та морфологічних ознак берези після 1, 4 та 8 пересадок М. N. Brand та R. D. Lineberg [176] показали, що в процесі субкультивувань відбулися значні морфологічні та біохімічні зміни. Їхній прояв у мікроклонованих дерев дуже відрізнявся від материнських і був подібний до характеристик, властивих сіянцям.

Нами також встановлено ознаки ювенілізації у виду *Solanum tuberosum*. За першого культивування із експланта-насінини утворювалися ювенільні листки, а у випадку регенерації рослин із бруньок пагона *in vivo* утворювалися типові непарно перисто-розсічені листки (рис. 2.1). Але за подальшого субкультивування живцюванням утворювалися регенеранти із ювенільними листками, незалежно від того, були це регенеранти з бульбами чи без них. Тобто походження експлантів впливає на розвиток регенерантів, але в *in vitro* ювенілізація відбувається дещо по-іншому.

Для деревних також відзначено, що, незалежно від виду, живці, взяті від пагонів з ювенільними ознаками, завжди мали вищу ризогенну здатність, а їх саджанці – більший річний приріст пагонів, що значно прискорювало отримання садивного матеріалу [42]. Під час введення в культуру *in vitro* акліматизованої в Україні шовковиці білої, найкращого результату було досягнуто за умови відбору бруньок ювенільних рослин на початку періоду вегетації [33]. Для культивування рододендронів, як і для багатьох інших деревних рослин, встановлено, що ліпші регенераційні властивості мають ембріональні та ювенільні тканини. Вони краще зберігають життєздатність і швидше розмножуються [161, 217]. Зрілі тканини характеризуються 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 зберігається в несприятливих умовах зимового періоду у формі видозміненого підземного стебла – бульби, а за сприятливих 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.

Згідно з даними Ю.Г. Тринклера [154], картопля має великий та малий цикли онтогенезу. Великий цикл – це тривалість життя сорту (клону), а малий, або 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, зумовлюється 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. На їх позначення вживають поняття: “життєвий цикл” або “онтогенез”.

У нативних умовах (*in vivo*) – онтогенез однорічного пагона у всіх покритонасінних рослин включає ряд послідовних етапів органогенезу [74]. Перехід від одного до іншого ініціюється внутрішніми і зовнішніми факторами (фотоперіод, сума ефективних температур, накопичення в організмі тих чи інших речовин тощо).

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, органу або популяції клітин має вигляд S-подібної кривої (рис. 2.2). Вона складається з 4-х фаз росту: I лаг-фаза – фаза прихованого росту, яка властива переважно ембріональному етапу онтогенезу та розвитку насіння до проростання. За такого росту організм помітно не збільшується в розмірах. Ця фаза характеризується новоутворенням нуклеїнових кислот (ДНК і РНК), біосинтезом білків-ферментів і фітогормонів [93].

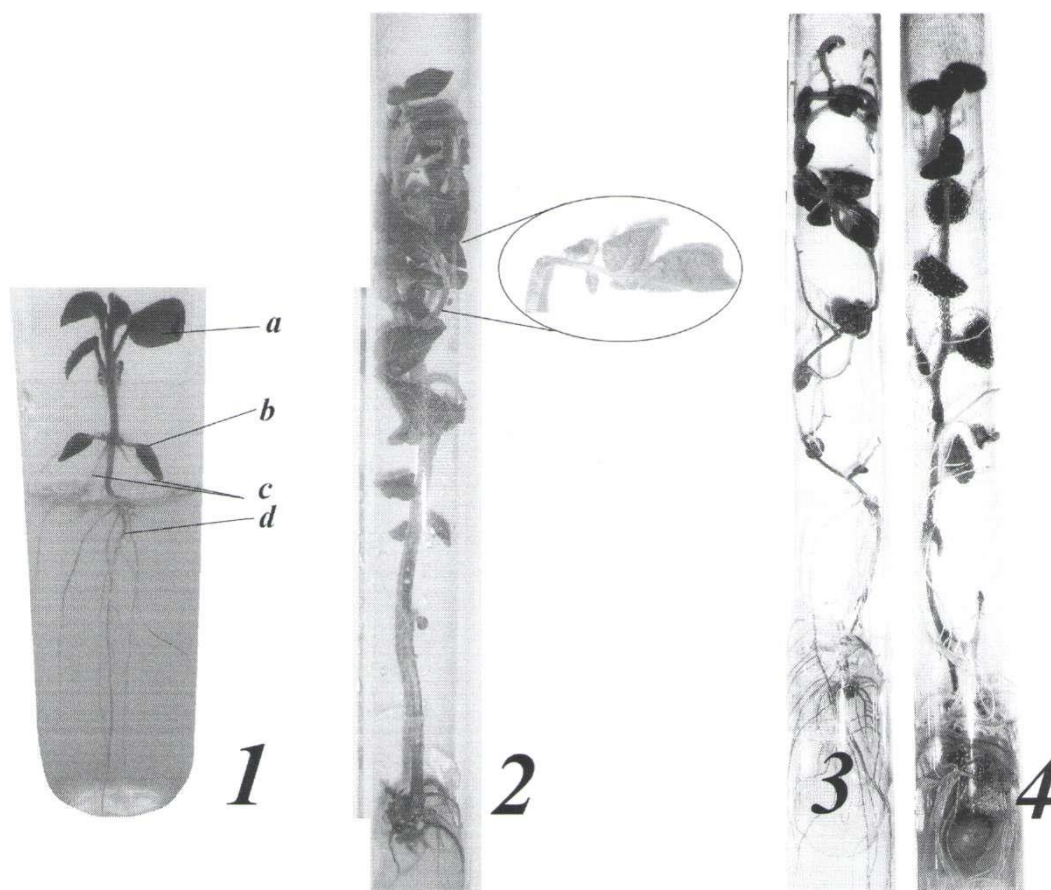


Рис. 2.1. **Форми листків *Solanum tuberosum* залежно від походження експлантів:** 1. Як експлант використано насінину: а - ювенільні листки; b - ембріональні сім'ядольні листки; c - вторинна коренева система; d - зародкова коренева система.

2. Як експлант використано бруньки *in vivo*.
3. Рослина-регенерант після субкультивування
4. Рослина-регенерант після субкультивування на середовищі з індукторами бульбоутворення

II лог-фаза – фаза інтенсивного росту. Вона 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 це, перш за все, стосується вегетативних органів: стебел, листків, коріння. За нашими спостереженнями в цій фазі найкраще відбувається регенерація вегетативних органів.

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

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

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

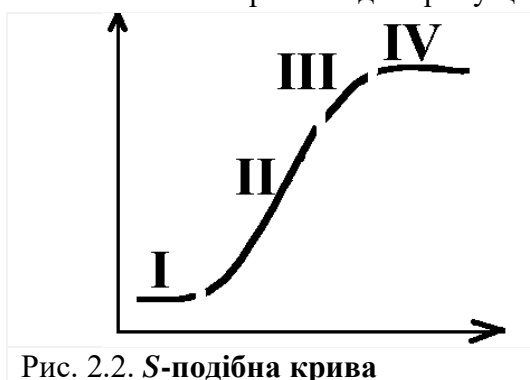


Рис. 2.2. S-подібна крива

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

Для всіх покритонасінних рослин характерна однакова послідовність розвитку конуса наростання. Згідно із твердженням Ф.М. Куперман [74] розвиток однорічного пагона проходить в 12 етапів органогенезу (рис. 2.3).

Перші його етапи, які співпадають з ювенільним періодом індивідуального розвитку, ще називають вегетативними. У цих періодах рослинам властивий посилений ріст і висока регенераційна здатність. Однак, із переходом до репродуктивних етапів органогенезу, які зовні проявляються в картоплі, як початок бутонізації, регенераційна здатність рослин різко знижується або взагалі втрачається [7].

В умовах *in vitro* за МКР нові рослини регенеруються з бруньок у процесі живцювання материнських рослин, що мають 9-15 вузлів. При такому розмноженні складається враження, що рослини не завершують свого онтогенетичного циклу впродовж 10-15 і більше років.

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

Відрізняють первинні й вторинні механізми росту. До перших відносяться фізіолого-біохімічні реакції, що забезпечують початкові етапи

ростового процесу (лаг-фаза) і фази прискореного росту (лог-фаза) [19]. Сюди ж належать електрофізіологічні, гормональні й генетичні реакції, які запускають і підтримують нормальний хід росту клітин, тканин і органів [114].

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) [114].

Згідно із даними Ж. Берньє та інших дослідників [7, 36, 85], якщо вирощувати рослини у чітко визначених неіндукованих умовах, вони

можуть тривалий час знаходитись на певному етапі розвитку. Також за тривалої відсутності індукуючого впливу можливим є повернення меристем до попереднього етапу (типове для меристем у вегетативному стані).

Встановлено залежність між формою хвої у вихідних рослин і ефективністю регенерації рослин з експлантів. Останні, що мали лускоподібну хвою, регенерували рослини з меншою кореневою системою та меншою кількістю пагонів. При подальшому субкультивуванні ці регенеранти втрачали потенціал для росту і розвитку. Зокрема, через зменшення кількості пагонів та поганого їх вкорінення знижувався коефіцієнт розмноження. Використання згаданого типу експлантів дозволяло підтримувати в культурі тую західну лише впродовж 4-5 субкультивувань. Добір для МКР вихідних рослин лише з ювенільною формою дозволив тривалий час – більше восьми років – підтримувати цей вид рослин в культурі *in vitro*.

Тобто ми припускаємо, що рослина-регенерант в умовах *in vitro*, яка утворилася за вегетативного розмноження, проходить лише вегетативні етапи онтогенезу, на відміну від рослин за насінневого розмноження *in vivo* (рис. 2.4).

У деревних рослин, особливо деяких родів хвойних, виділяють ювенільні та звичайні фотосинтезуючі органи (листки, хвоя). Нами під час МКР *Thuja occidentalis* 'Smaragd' виявлені регенеранти з різними формами хвої. Одні з них мали лише голкоподібну (ювенільну), а інші лускоподібну і частково ювенільну форми (табл. 2.1, рис 2.5).

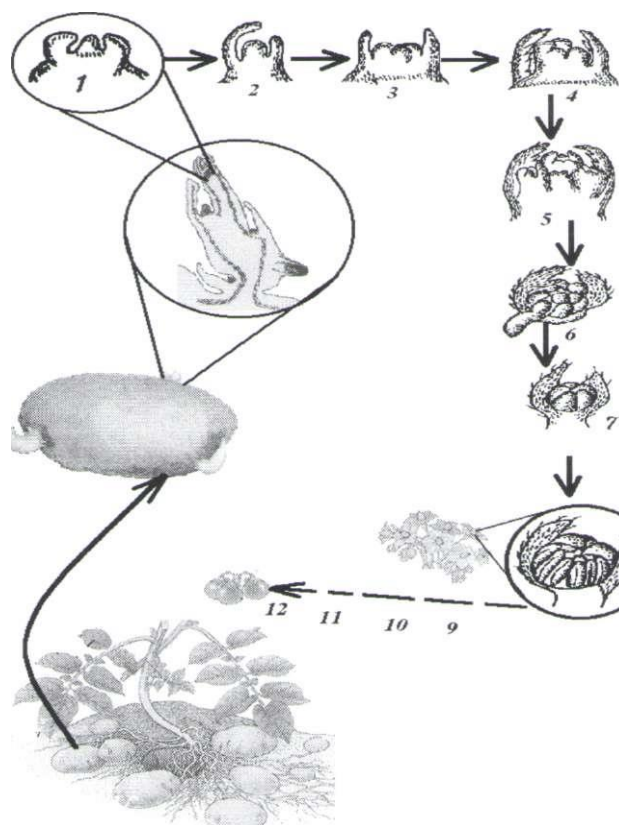


Рис. 2.3. Схематичне зображення етапів онтогенезу картоплі

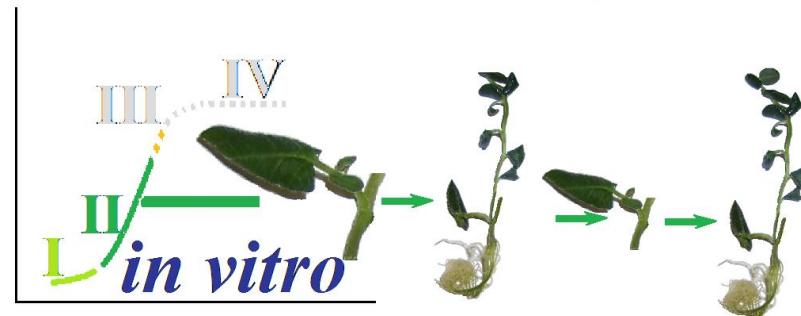
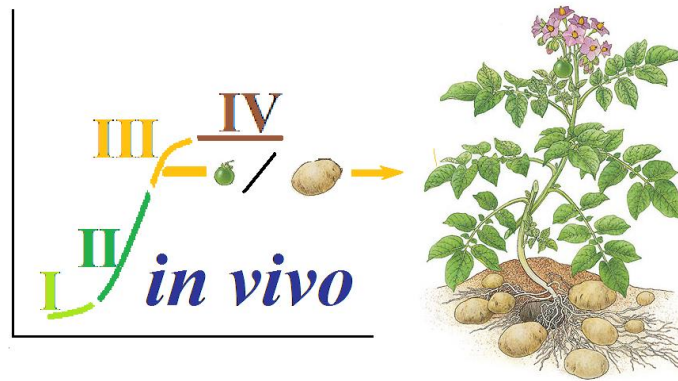


Рис. 2.4. S-подібна крива росту рослин *in vivo* та *in vitro*



Регенерант з ювенільною та лускоподібною хвоєю



Регенерант з ювенільною хвоєю

Рис. 2.5. Види регенерантів *Thuja occidentalis* 'Smaragd' за типом хвої

Таблиця 2.1

Вплив форми хвої експлантів на тривалість МКР туй західної

Форма хвої експлантів	Коефіцієнт розмноження за субкультивування				Максимальна кількість субкультивувань, шт.
	перше	друге	третє	НІР ₀₅	
Ювенільна	7,8	15,1	14,7	0,4	11 і більше
Лусковидна	4,1	3,2	0,5	0,3	4-5
НІР ₀₅	0,3	0,4	0,3	-	

Під час постасептичного вирощування *in vivo* пробіркові рослини поступово набували лускоподібної хвої та типових ознак, властивих *Thuja occidentalis* 'Smaragd' (рис. 2.6). Тобто створилися умови, за яких відбувся повний перехід від ювенільного до наступних етапів розвитку.

Набуття ювенільних ознак *in vitro* відомо для багатьох культур. Зокрема, порівняльна оцінка розмноження зеленими живцями двох сортів вишні свідчить про доцільність використання маточними рослинами, які розмножені в культурі тканин. При використанні живців із розмножених *in vitro* рослин відсоток вкорінення збільшувався в 2-4 рази, кількість коренів в – 1,6 - 3,2 рази, порівняно із звичайною технологією живцювання [123].

У ювенільних рослин *Laelia Lindl.* у пазухах термінальних листків розташовуються резервні бруньки поновлення, з яких в майбутньому розвиваються окремі рослини. Характерно, що в генеративнозрілих екземплярів цього виду подібні бруньки не виявлені [54].

Отже, крім надзвичайно високих коефіцієнтів розмноження за культури меристем, МКРР дозволяє отримати ювенільні рослини. Для довготривалого культивування в асептичних умовах необхідно використовувати вихідні експланти *in vitro* для живцювання з ювенільних рослин.



Рис. 2.6. Зміна форми хвої за постасептичної адаптації протягом 45 днів *Thuja occidentalis* 'Smaragd'

2.4. Гетеротрофне живлення як одна з причин ювенільного стану регенерантів в умовах *in vitro*

У нативних умовах більшість вищих рослин основну частину життя ведуть як автотрофи. Лише в період формування проростків із насіння або органів вегетативного розмноження рослинному організмові властивий гетеротрофний спосіб існування, що відбувається за рахунок поживних речовин запасуючих органів.

Ювенільний період онтогенезу М.М. Макрушин розділяє на гетеротрофну й автотрофну фази. Гетеротрофна натомість 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 відбувається за рахунок запасних речовин ендосперму. З утворенням перших продуктів фотосинтезу починається автотрофна фаза [36].

Більшість технологій культивування рослинних об'єктів *in vitro* передбачає додавання у живильне середовище вуглеводів, які за хімічною природою і 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. Для цього ж у живильні середовища додають дисахариди (наприклад, сахарозу), рідше моносахариди (глюкозу) або полісахариди - крохмаль. Водночас більшість дослідників притримуються думки, що за наявності вуглеводів *in vitro* рослинні об'єкти взагалі не фотосинтезують або надходження поживних речовин за рахунок фотосинтезу незначне. Інколи це називають міксотрофним способом живлення, адже автотрофна доля в ньому дуже мала [56, 73, 78].

Маємо усі підстави вважати, що вирощування рослин на штучних живильних середовищах дозволяє рослинним клітинам, цілим організмам проявляти гетеротрофний спосіб живлення.

Прикладом впливу гетеротрофного способу життя рослин *in vitro* можуть бути картопля, гвоздика. Картопля в нативних та асептичних умовах розмножується вегетативно. Однак розвиток листка відбувається по-різному. У відкритому ґрунті упродовж періоду вегетації на пагоні відбувається формування різних за формою листків (рис. 2.7.). Зокрема, під час проростання бульб на поверхні ґрунту з'являються ювенільні листки з простою, не диференційованою пластинкою. З часом простий листок перетворюється в складний розсічений.

Водночас *in vitro* на штучних живильних середовищах з сахарозою формуються прості невеликі листки за зовнішнім виглядом схожі на ювенільні листки у відкритому ґрунті. Існує припущення, що причиною відхилення розвитку регенерантів є невелика місткість культурального посуду [78]. Однак, якщо навіть збільшити місткість з 40 мл до 500 мл (більш як в 10 разу), регенеранти за розвитком листової пластинки відрізняться не будуть (рис. 2.8).

Раніше встановлено, що за культури *in vitro* в регенерантів формується проста, майже не розсічена пластинка, а за наступних пасажувань в умовах закритого ґрунту, розсіченість листової пластинки посилюється. Причиною цього може бути поступова індукція переходу апікальних меристем від вегетативного до генеративного періоду онтогенезу [36].

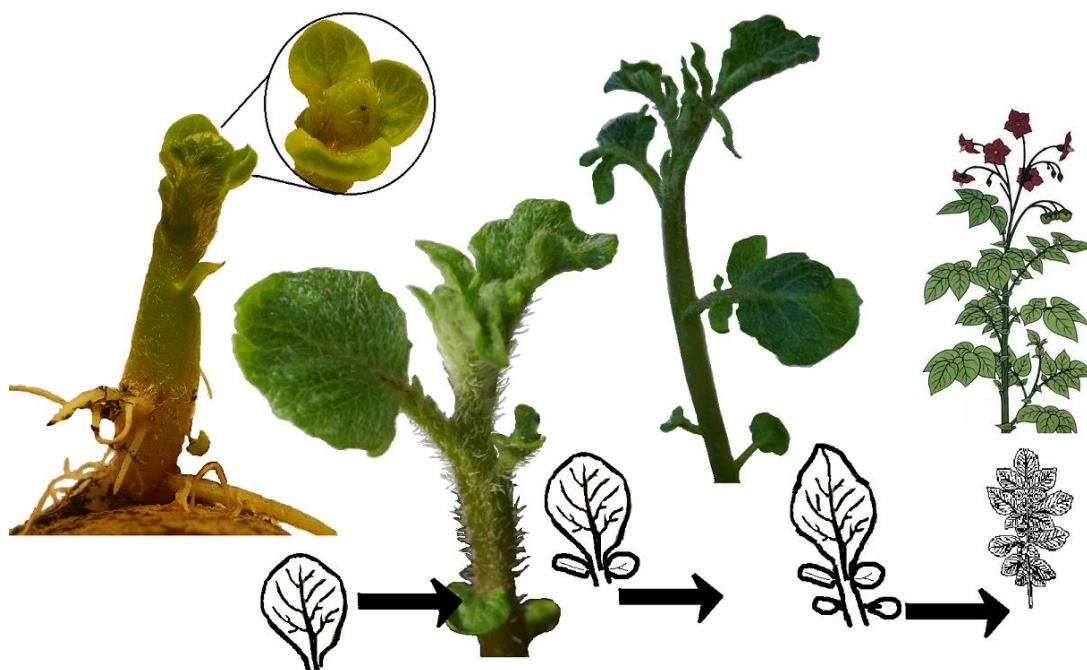


Рис. 2.7. Особливості формування листків рослин картоплі в звичайних умовах

Під час культури меристем та МКРР відбувається індукція процесів дедиференціювання і подальшої проліферації клітин через перепрограмування геному на "ювенілізацію" його стану [73], яка підтримується в культурі тканин тривалий час. Наприклад, в Інституті картоплярства НААН багато сортів підтримуються *in vitro* 5-10 і більше років [90]. Увесь цей час листки в рослин мають прості недиференційовані пластинки, подібні тим, які в нативних умовах властиві картоплі під час початкових ювенільних етапів онтогенезу.

Таким чином, в асептичних та на початку розвитку в нативних умовах рослинам властиве гетеротрофне живлення за рахунок запасних поживних речовин бульби або сахарози штучного живильного середовища. Дослідження впливу автотрофного і гетеротрофного живлення на формування листкової пластинки і розвиток регенерантів загалом, ще не завершені і є актуальними з практичної та теоретичної точок зору.

У зв'язку з цим, нами проведено дослідження за такою схемою. Рослини *in vitro* висаджували на живильні середовища: 1) без сахарози, 2) з 3% сахарозою, 3) з 6% сахарозою, 4) з 9% сахарозою (табл. 2.2). Згідно зі згаданою схемою проводили три субкультивування шляхом накладання. Оскільки агар-агар є полісахаридом [78], для усунення його впливу, як джерела гетеротрофного живлення рослин їх вирощували на рідкому живильному середовищі. Повторність дослідження чотириразова, по 30 регенерантів у кожному повторенні.

Встановили, що різні концентрації сахарози в живильному середовищі обумовлювали різний розвиток регенерантів картоплі та гвоздики (рис. 2.9).

Найбільші листкові пластинки формувалися в регенерантів, вирощених на середовищі без сахарози. Зокрема, у картоплі сорту "Подольнка" за першого субкультивування листя в регенерантів на середовищі без сахарози становила 380 мм² на одну рослину.



Рис. 2.8. Культивування картоплі *in vitro*:
 1. культуральна ємність 40 мл;
 2. культуральна ємність 500 мл.

Таблиця 2.2

Вплив екзогенної сахарози на розвиток пагона картоплі *in vitro*

Кількість сахарози, %	Площа, листків, мм ²			Висота пагона, мм		
	1*	2	3	1	2	3
сорт "Подільянка"						
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

* 1, 2, 3 пасаж (субкультивування)

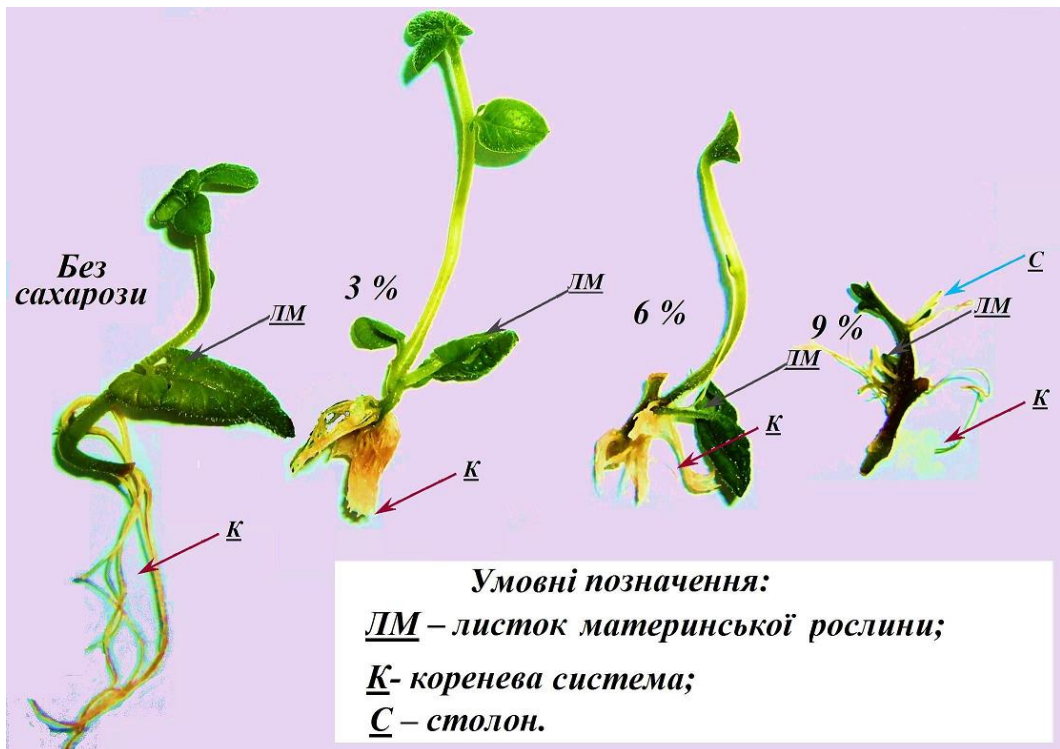


Рис. 2.9. Розвиток регенерантів картоплі *in vitro* залежно від концентрації сахарози (1 пасаж)

Додавання трьох відсотків сахарози зумовлювало зменшення площі листя до 331 мм². Найменша площа листя в досліді була за додавання в середовище найбільшої кількості сахарози (9%) – 39 мм², що становило лише 11,8 відсотків від площі листя в регенованих рослин без сахарози. Подібне встановлено і в регенерантів сорту картоплі “Слов’янка”. Зі збільшенням кількості сахарози зменшувалася площа листків з 413 мм² до 68 мм². У останньому варіанті вона становила лише 16,5% від площі листків у регенованих рослин без екзогенної сахарози. У регенерантів гвоздики також помічена подібна тенденція, що видно з рисунку 2.10.

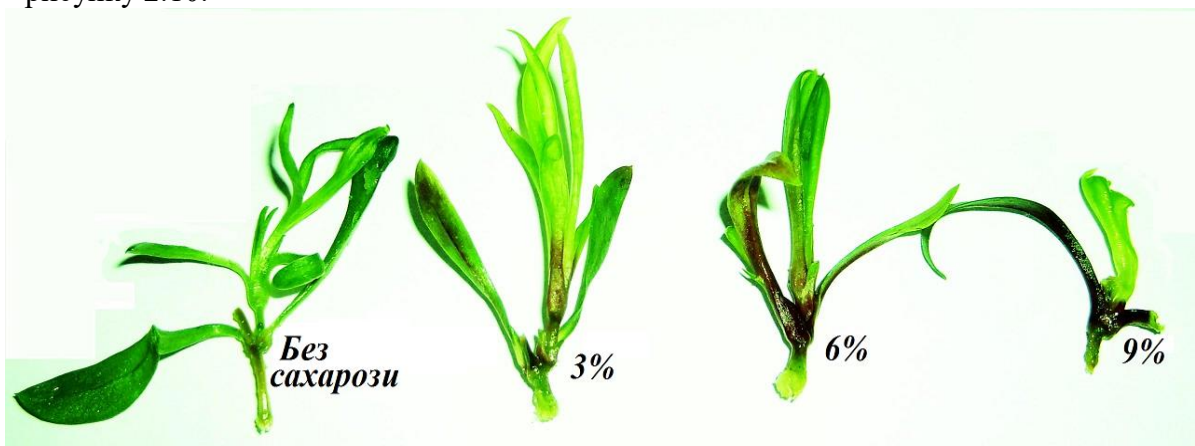


Рис. 2.10. Розвиток регенерантів гвоздики *in vitro* залежно від концентрації сахарози (1 пасаж)

Також відбулися зміни листків, які регенерант "отримав" від материнської рослини. За відсутності сахарози регенерант активно використовував цей листок, про що свідчить збільшення його розмірів. У регенерантів, вирощених на середовищах із сахарозою, не спостерігалось збільшення площі згаданих листків. Вважаємо, що збільшення величини материнських листків на середовищі без сахарози пов'язане з необхідністю, автотрофного живлення. При гетеротрофному живленні (середовища із екзогенною сахарозою) в рослині відсутній стимул росту фотосинтезуючих органів.

За винятком варіанту із додаванням 30 г/л сахарози, з кожним наступним субкультивуванням площа листків зменшувалася. У сорту "Подольянка" без сахарози це становило 380 мм² при першому культивуванні і 103 мм² – при третьому. У цих умовах також змінювалася форма листкової пластинки, коренева система (рис. 2.11).

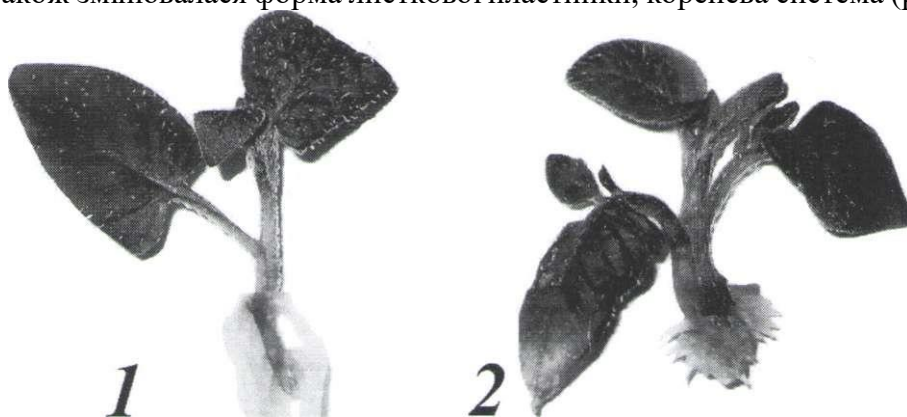


Рис. 2.11. Зміни форми листкової пластинки та розвитку кореневої системи в регенерантів, вирощених на середовищі без сахарози залежно від кількості субкультивувань (1 – 1-й пасаж, 2 – 3-й пасаж).

В умовах *in vitro* відмічені зміни інтенсивності ризогенезу (табл. 2.3). Регенеранти без сахарози на штучному живильному середовищі формували довшу кореневу систему, однак кількість коренів була меншою. Найбільша кількість коренів відмічена при регенерації рослин картоплі обох сортів на середовищі з трьома відсотками сахарози.

Таблиця 2.3

Вплив екзогенної сахарози на ризогенез регенерантів картоплі *in vitro*

Кількість сахарози, %	Довжина кореневої системи, мм			Кількість коренів, шт.		
	1*	2	3	1	2	3
Сорт Подольянка						
0	119±2	43±1,6	31±1,2	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

* 1, 2, 3 пасаж (субкультивування)

У регенерантів з автотрофним типом живлення з кожним наступним пасажем зменшувалася як кількість, так і довжина коренів. Водночас зменшувалася інтенсивність ризогенезу при збільшенні кількості сахарози до 6 та 9%. Серед досліджуваних варіантів найменша інтенсивність ризогенезу відмічена в середовищі із 9% сахарози. Припускаємо, що причиною цього може бути зміна донорно-акцепторних відносин – зменшення надходження речовин до пагона та інтенсивний їх відтік у стolonну зону.

Тип вуглеводного живлення регенерантів *in vitro* також впливав і на бульбоутворення (табл. 2.4). При автотрофному живленні утворювалася найменша кількість мікробульб, що також спостерігалось в кожному наступному субкультуванні. Додавання в середовище великої кількості сахарози (60 і 90 г/л) спричинило утворення значно більшої кількості бульб, порівняно з автотрофним типом живлення і трьома відсотками сахарози. За кількістю і масою мікробульб серед досліджуваної кількості сахарози оптимальною для сорту “Подольянка” було 60 г/л, а для сорту “Слов'янка” - 90 г/л. Отже, кількість мікробульб сортів “Подольянка” і “Слов'янка” залежала від концентрації в живильному середовищі екзогенної сахарози.

Таблиця 2.4

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 Подольянка						
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

У регенерантів картоплі за трьох послідовних субкультувань відбулися зміни форми листкової пластинки. За умови першого живцювання регенерантам усіх варіантів властива проста не розсічена пластинка. Однак, при третьому пасажі під час автотрофного живлення відбувалася диференціація листової пластинки. На нашу думку, зміни її форми під час автотрофного живлення пов'язані з індукцією переходу регенерантів до наступних етапів органогенезу. Одним з індукторів його може бути утворення абсцизової кислоти, що синтезується внаслідок розпаду за автотрофного живлення одних з пігментів фотосинтезу – ксантофілів [76, 77].

Отже, можна зробити наступні висновки:

1. Під час МКРР за гетеротрофного живлення стимулюється перехід від вегетативного до генеративного розвитку, відсутні зміни в генезисі листкової пластинки регенерантів.

2. За умови впливу індукуючих умов, рослини картоплі переходять до бульбоутворення і змінюється генезис листкової пластинки.

2.5. Вплив живлення на розвиток листків регенерантів хости

За морфологічними ознаками рослини хости *in vitro* відрізнялися від тих, що ростуть *vivo*. Окрім зменшення розмірів та набуття ознак ювенільності в рослин змінювалася форма, забарвлення листків. Згідно з нашими даними, лише за культивування впродовж 1-2 місяців у теплиці рослини хости набували типових ознак сорту.

Доведений вплив на форму і розміри листків хости концентрації елементів живлення (рис. 2.12). Зниження концентрації мінеральних елементів у середовищі в два рази (MS1/2) обумовило зменшення кількості листків, вкорочення, округлення листкової пластинки зменшення довжини та товщини черешка, порівняно із контролем (живильне середовище за прописом MS). Ці зміни проявлялися також у зменшенні діаметру прикореневої 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. Крім цього, також зменшилася із 2,3 до 1,4 шт. кількість пагонів на рослину, тобто знизився коефіцієнт розмноження.

Примітка: скороченню MS відповідає середовище Мурасіге і Скуга повна концентрація;

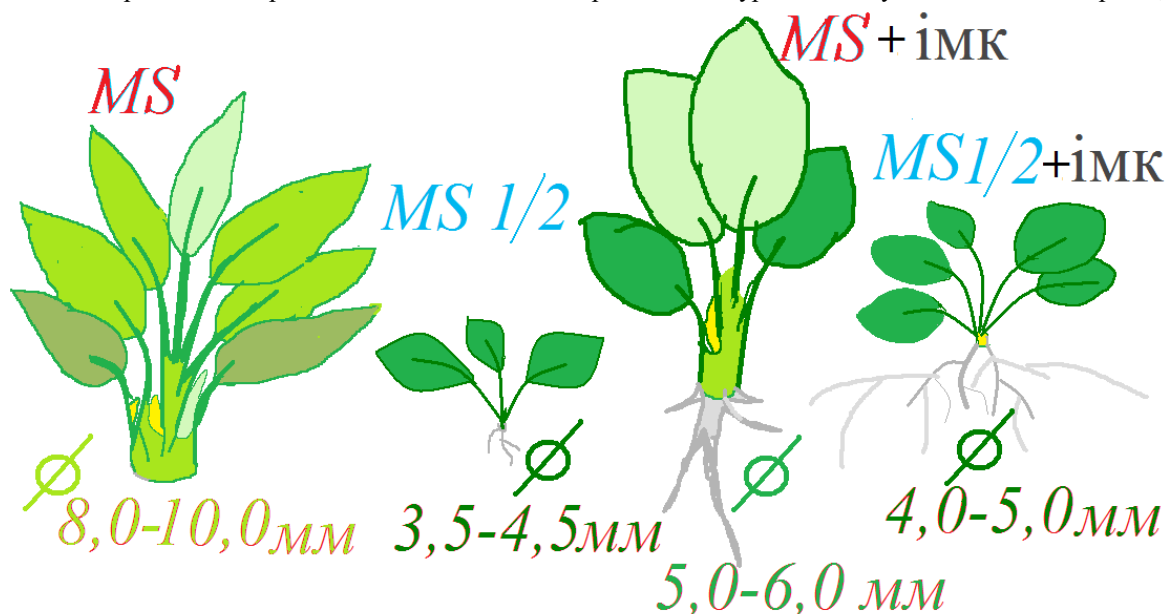


Рис. 2.12. Вплив концентрації мінеральних елементів на морфогенез регенерантів хости

MS1/2 - середовище Мурасіге і Скуга половинна концентрація; IAK - додавання індолілмасляної кислоти (4 мг/л); ∅ - діаметр прикореневої зони пагона.

Додавання в середовище ауксину (IAK, 4 мг/л) спричинило індукцію ризогенезу і подовження черешка. Вважаємо, що причина викладеного в стимуляції ауксинами ксилемоутворення [19, 95] і, як наслідок, збільшення ксилемної складової черешка, його товщини.

Додавання активованого вугілля також обумовлювало утворення вкороченої листкової пластинки овальної форми, але розміри листків збільшувалися, порівняно із регенерантами, вирощеними без цього компонента.

Поряд із зміною розмірів листя хости встановлено також відмінності його пігментації, що проявлялося, наприклад, у строкатолистості форм хости (сортів “Патріот”, “Вайт Брім”). На середовищі із половинною концентрацією мінеральних елементів живлення згадана ознака проявлялася чітко. Додавання ауксину сприяло зміні забарвлення ділянок із білого кольору на світло-салатовий. На середовищі з повним набором мінеральних елементів (контроль) ці ділянки листка набували світло зеленого кольору і майже не виділялися на загальному фоні листкової пластинки.

Також відмічено негативну післядію вирощування вихідних для живцювання рослин на збідненому середовищі (MS1/2). Таке потомство за біометричними показниками поступалося контролю (рис. 2.13).

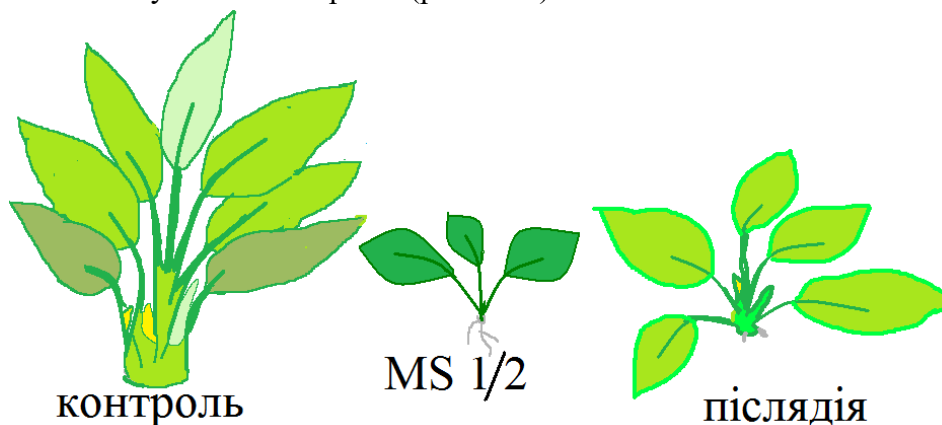


Рис. 2.13. Післядія вирощування вихідних для живцювання рослин на збідненому середовищі

При порівнянні морфогенезу регенерантів хости на середовищах із різною концентрацією агар-агару 0,7% (контроль), 0,9% (загущене), 0,5% (зріджене) встановлено, що на генезис листків впливає консистенція середовища (рис. 2.14). На зрідженому середовищі, як порівняти з контролем, рослини формували в 2- 2,5 разу довші листкові пластини і водночас вужчі в 1,5-2,0 разу.

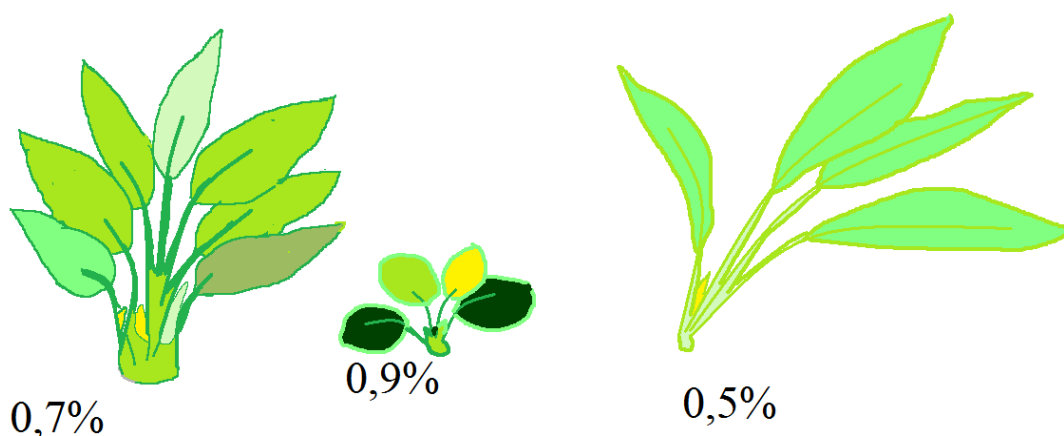


Рис. 2.14. Генезис листків хости залежно від консистенції агаризованого середовища, де 0,7%, 0,9% - концентрації агар-агару

Окрім концентрації елементів мінерального живлення, гормонів, активованого вугілля при культивуванні хости виявлений вплив на ріст рослин *in vitro* концентрації вуглеводів (сахарози). У процесі отримання регенерантів на середовищах без сахарози та з додаванням її від 10 до 60 г/л виявлено такі особливості (рис. 2.15). При автотрофному живленні регенеруються рослини з 2-3 листками і великими темно-зеленими листовими пластинками. За нашими спостереженнями, такі листки регенеранти сформували під час живцювання від вихідних материнських рослин, а розростання їх зомовлене автотрофним способом живлення.

Зі збільшенням концентрації сахарози як джерела гетеротрофного живлення, розміри листових пластинок зменшувалися. Найсильніше це проявлялося коли концентрація перевищувала 4%.

Максимальна кількість листків (від 4 до 7 шт./рослину) відмічена, якщо за концентрація сахарози становила від 2 до 4%. Переважна кількість пагонів спостерігалася на середовищах із 3 і 4% сахарози. Збільшення вмісту вуглеводу зменшувало розміри, кількість листків та число пагонів.

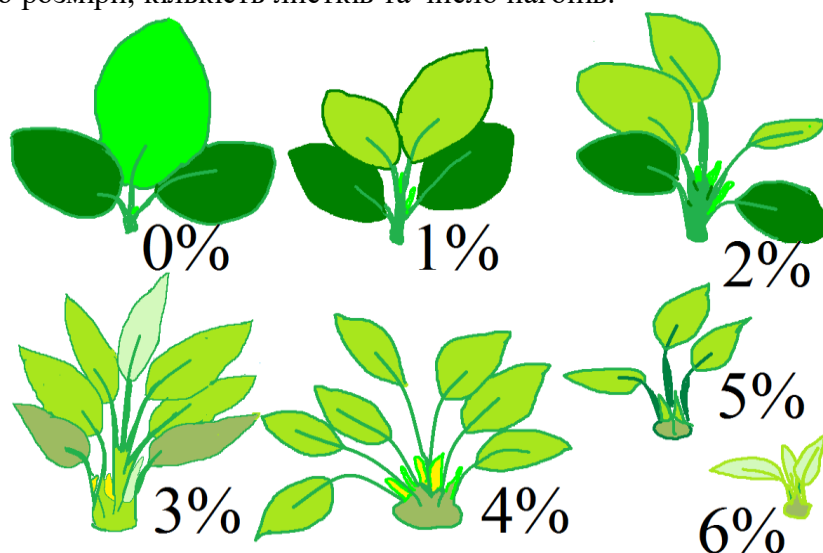


Рис. 2.15. Вплив концентрації сахарози в живильному середовищі на морфогенез регенерантів хости

Встановлено вплив на генезис листків та морфогенез пагона введення вихідних для живцювання рослин (маточних рослин) в стан спокою (рис. 2.16, 2.17). За таких умов відмічалася потовщення пагона в прикореневій зоні з одночасним всиханням листків. Вважаємо, це пов'язано із відтоком пластичних речовин із листових пластинок до денця, пазушних бруньок.

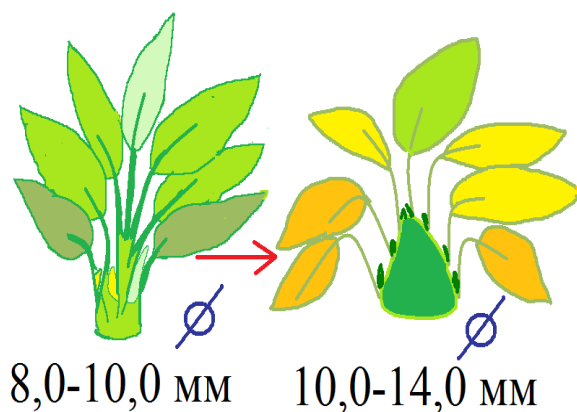


Рис. 2.16. Зміна прикореневої зони пагона хости у зв'язку із введенням регенерантів в стан спокою

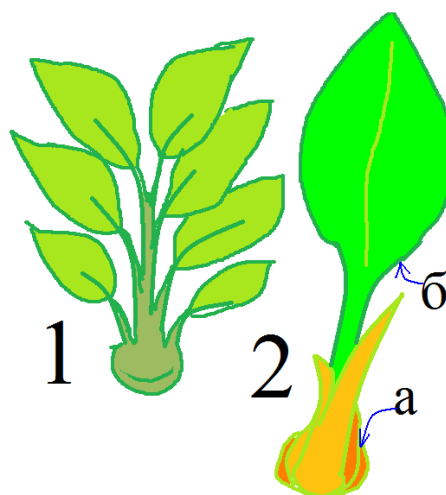


Рис. 4.17. Особливості регенерації регенерантів хости залежно від введення маточних рослин у стан спокою: 1. не вводилися в спокій, 2. вводилися в спокій (а – лускоподібні листки, б – типові листки).

Після пробудження екслантів (ізолюваних пагонів) із рослин, що знаходилися в стані спокою, розвиток листків виявився типовим для нативних умов. Спочатку з'явилися верхівки листків, які *in vivo* виконують функції "пробивних листків", бо вони розсовують ґрунт, надаючи можливість нижнім листкам досягнути поверхні ґрунту. У пробивних листків у штучних і нативних умовах майже не розвивається листкова пластинка. Вона залишалася лускоподібною і короткою, тобто виконувала ту саму функцію, що й луска бруньок у дерев. Головне для їх обох - захист більш ніжних органів, наприклад, меристем. Ці листки називають катафілами або листками низової формації, тому що розміщені вони нижче решти листків на пагоні. Потім утворюються типові листки із листковою пластинкою. Інтенсивний розвиток 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 проходження ними стану спокою.

2.6. Асинхронний розвиток регенерантів під час МКРР

На всіх етапах онтогенезу вищих рослин відбувається регуляція процесів росту, морфогенезу та функцій рослинного організму. Постійну перебудову їх зв'язків забезпечує реалізація генотипу [114]. Досить важливе значення в цих процесах належить впливу корелятивних взаємозв'язків на регенерацію, розвиток регенерантів та їх різноякісність.

Наприклад, при використанні експлантами бруньок (хоста, гладіолус, бузок) спостерігався їх верхівковий ріст, та внутрішньобрунькове гілкування [109, 111, 170, 171]. Як наслідок, утворювалися складні аксиллярні комплекси, в межах яких зародки бруньок відрізнялися різним ступенем диференціації. Множинне закладання метаморфозних бруньок (цибулин) *in vivo* спостерігалось у тюльпана [142].

У дослідженнях із *Arnica foliosa* Nutt. встановлено, що середня кількість мікропагонів на експлант, як характеристика його регенераційної здатності, залежала від місця розташування сегмента на стеблі. Сегменти, що міщені в базальній частині, регенерували в два рази більше мікропагонів, ніж верхівка і в 1,5 рази більше, ніж сегменти середньої частини стебла [49, 51]. Окрім неоднакового розвитку бруньок, відмічався вплив походження живців на ризогенез. Наприклад, для *Ilex aquifolium* найкраще вкорінення і найбільша загальна довжина коренів характерні для верхівкових живців [62].

У культуру *in vitro* картоплю та інші рослини вводять з використанням меристем або живців із бруньками, регенерація яких детермінується станом та розміщенням їх на пагоні вихідної рослини. Регенеранти меристем з бруньок, що розташовані в різних частинах стебла, відрізняються між собою [90].

Так, меристеми з верхівки пагона (рис. 2.18), порівняно із іншими, мають більші розміри, а експланти, які ізольовані із зачаткових бруньок під верхівкою пагона – найменші. Меристеми із сформованих бруньок, що розташовані в середині стебла, за формою схожі на експланти з верхівкової бруньки, але дещо менші.

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

За умови отримання рослин *in vitro* з бруньок, останні, подібно до меристем, також нерівноцінні між собою за регенераційною здатністю, однак, порівняно з меристемами, вони швидше регенерують рослини [92]. На регенераційну здатність також впливають соротові особливості культури.

Дослідженнями, виконаними в Інституті картоплярства НААНУ в 2000-2004 рр. з аналізу ефективності культури меристеми картоплі, встановлено вплив сортових особливостей (генотипу) на регенераційну властивість їх експлантів. Залежно від сорту, вихід регенерантів із меристем знаходився в межах від 27 до 98 % [90].

Регенеровані з меристем рослини картоплі різних сортів за однакових умов розвивалися по-різному. Доведено, що висота рослин обумовлюється генотипом і за 30 днів культивування *in vitro* становила від 45,5 мм у сорту “Либідь” і до 123,7 мм у сорту “Агрія, тобто різниця за висотою була майже три рази. Сортові особливості за вирощування рослин *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 [90].

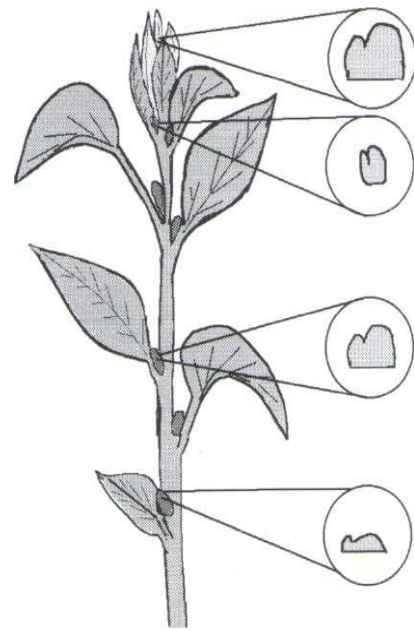


Рис. 2.18. Форма та розмір меристем картоплі залежно від розміщення на стеблі

У процесі живцювання пробіркових рослин, залежно від розміщення живців на материнській рослині, виявлено відмінності в розвитку регенерантів серед одного і того ж сорту. Для визначення цього впливу досліджували походження та зміни регенераційного процесу у живців, ізольованих із трьох зон материнської рослини *in vitro*: I - верхівка рослини, II - серединна зона стебла, III - базальна зона стебла (рис. 2. 19) протягом 10 пасажів методом накладання.

Доведено, що регенеранти з базальної частини стебла, порівняно з іншими варіантами, відстають у рості і розвитку. З кожним наступним пасажем регенерація рослин із цих живців вповільнювалася, а у 8 -10 пасажі в таких регенерантів майже відсутня коренева система, стебло коротке з 4-5 міжвузлями. Рослини, регенеровані із живців середньої зони стебла впродовж 10 живцювань стабільно розвивалися, формували однотипні міцні стебла з добре розвиненими листками і кореневою системою, але з проявом меншим, ніж у верхівкових живців.

Серед досліджуваних варіантів найвищі темпи росту і розвитку спостерігали в регенерантів із верхівки стебла до 4 - 5 живцювання. Зокрема, вони мали найвищу висоту стебла, найбільшу масу кореневої системи. Проте, при наступному регенеруванні (після 4 - 5 пасажу) ріст і розвиток рослин вповільнювався і вони за біометричними показниками ставали близькі до регенерантів із медіальної зони стебла [92].

Подібна тенденція простежувалася при вирощуванні розсади з рослин *in vitro* в умовах теплиці (рис. 2.20). Регенеранти, отримані з різних живців, мали неоднакові адаптаційні властивості, зокрема особливості походження вихідних живців позначалися на приживленні розсади.



Рис. 2.19. Відмінності в розвитку регенерантів картоплі залежно від походження живців (2 пасаж), сорт Слов'янка, де I А - живець з верхівки рослини, I В - регенерант з верхівкового живця (I А). II А - живець з серединної зони стебла. II В - регенерант з живця II А. III А - живець з базальної зони стебла, III В - регенерант з живця III А.



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

Рис. 2.20. Розвиток регенерантів картоплі в закритому ґрунті залежно від походження живців

Рослини з верхівкових живців, порівняно з іншими варіантами, характеризувалися здатністю до утворення великої листостеблової маси, а також більш розвиненої коревої системи. Це відіграє важливу роль у формуванні потенціалу майбутнього врожаю. Порівняльний аналіз продуктивності розсади *ex vitro* засвідчив, що рослини з верхівкових живців, як правило утворюють, пізніше і дещо меншу кількість бульб, однак середня їхня маса істотно вища, ніж у рослин з нижніх живців. Такі регенеранти, порівняно з іншими варіантами в межах сорту, мали на 7-8 днів довший період вегетації. Регенеранти з базальної частини стебла, що мали невеликі розміри листків, стебел та кореневої системи, швидше починали і завершували формування стolonів та бульб. Це зумовлювало коротший період вегетації, що і спричиняло нижчу урожайність [90, 92].

Встановлена залежність підтверджена і на інших культурах: хризантемі, гвоздиці. Доведено, що за першого живцювання на 30 день розвитку рослини регенеранти із живців з базальної частини пагону мали найменшу висоту, яка становила у хризантеми 79, а гвоздики - 66 мм (рис. 2.21, 2.22), а висота рослин із верхівок живців хризантеми сягала 189 мм, гвоздики - 117 мм. Стосовно живців із середини пагона це, відповідно, становило 136 і 78 мм. [67].



Рис. 2.21. Ріст і розвиток регенерантів хризантеми під час МКР залежно від походження живців

1. Регенеранти з живців, ізолюваних із апікальної частини пагона
2. Регенеранти з живців, ізолюваних із середньої частини пагона
3. Регенеранти з живців, ізолюваних із базальної частини пагона



Рис. 2.22. Ріст і розвиток регенерантів гвоздики в процесі МКР залежно від походження живців

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

Під час 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 порівнюючи з першими живцюваннями, висота істотно не змінювалася. Регенеранти з верхівок характеризувалися істотним зниженням висоти: у гвоздики вже після четвертого живцювання із 117 до 66 мм, а в хризантеми після шостого живцювання із 189 до 79 мм.

Походження живців впливало на розвиток як пагона, так і кореневої системи. Інтенсивність регенерації пагона корелювала з розвитком кореневої системи. У регенерантів із базальних живців поряд з незначною висотою пагона відмічено коротку кореневу систему. Причиною цього, на нашу думку, може бути недостатня кількість ауксинів, які синтезувалися у верхівках слабозвиннутих пагонів і повільно пересувалися вниз. Саме їх нестача зумовлювала слабкий розвиток кореневої системи. Припускаємо, що слабозвиннена коренева система зі свого боку синтезувала, як порівняти з іншими варіантами, меншу кількість цитокінінів, які в недостатній кількості надходили до апікальних живців й накопичувалися переважно в базальній частині регенерантів. Такий взаємовплив між частинами пагона відповідає загальноновизнаному положенню про корелятивний взаємовплив між надземною і підземною частинами рослини [19, 114].

У регенерантів з апікальних живців при перших субкультивуваннях спостерігався активний розвиток кореневої системи і пагона. Але згодом наступало вповільнення темпів регенерації. Причиною цього може бути зсув цитокінін-ауксинового індексу на користь ауксинів (нестача цитокінінів). Згідно з правилом Скуга-Міллера при нестачі цитокінінів гальмується розвиток меристем та бруньок [19, 95], а отже вповільнюється прямий морфогенез під час регенерації.

Окрім картоплі, хризантеми, гвоздики, встановлені закономірності підтверджені дослідженнями з двома представниками родів родини *Cactaceae* (табл. 2.5, рис. 2.23). На розвиток їх експлантів також впливало походження. За умови 8 годинного фотоперіоду експлантам з апікальної бруньки був властивий прямий морфогенез, тоді як у експлантів з базальної відмічено лише калюсоутворення в 67% *Sclerocactus spinosior ssp. Blanei Schlesi* і 21% у *Astropytum myriostigma v. Monstrosa cv. Lotus Land*, а також вповільнена регенерація.



Рис. 2.23. Вплив походження експлантів різних за походженням на материнській рослині на розвиток регенерантів (зліва із базального живця, праворуч морфогенез - апікального)

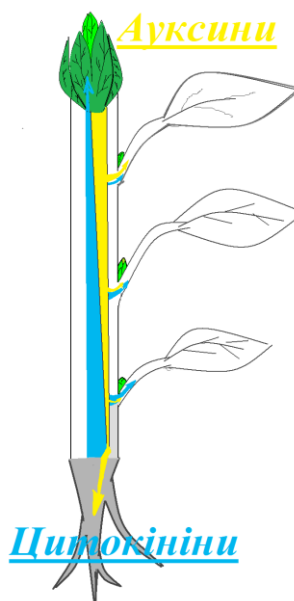


Рис. 2.24. Теоретична схема розподілу ауксинів та цитокінінів по бруньках вихідної для живцювання рослини

Вважається, що основною причиною асинхронного розвитку регенерантів є порушення в розміщенні ендогенних гормонів у межах материнської рослини. Це одна із проблем, яку необхідно усунути при промисловому МКР цих та інших видів рослин.

Загадані відмінності в регенераційному потенціалі різних за походженням живців пояснюються тим, що ріст і розвиток тканин, окремих органів і частин рослини перебуває в певному зв'язку, який проявляється у взаємовпливові одних частин на інші, які нерідко є досить віддалені за участю гормонів [19].

Отже, при МКР картоплі, гвоздики, хризантеми, склерокактусів, астрофітумів та хости між частинами вихідної рослини і окремими органами культур, що вивчалися, виявлені неоднакові регенераційні властивості під час мультиплікації *in vitro* тієї чи іншої культури.

Фітогормональний статус пагона та кореня є основним фактором корелятивних взаємозв'язків (рис. 2.25.). Верхівка пагона забезпечує синтез базипетальний і відтік ауксинів, які індують загальну генетичну програму коренеутворення, тоді як верхівка кореня продукує цитокиніни, які, рухаючись акропетально, після надходження в надземну частину рослини ініціюють програму утворення, росту та активності листків [83]. Пагін впливає на корінь через постачання йому ауксинів, а корінь забезпечує свій вплив на пагін через індукцію цитокинінів. Коли рослина втрачає частину органів внаслідок порушення стимуляційних або інгібіторних кореляцій спостерігається підсилення або уповільнення функцій інших [36, 85].

Таблиця 2.5

Вплив походження експлантів різних за розміщенням на материнській рослині на розіток регенерантів (1 мг/л БАП та 1 мг/л ІМК)

Походження експлантів	Калюсогенез, %	Морфогенез, %	
		повільний *	швидкий
<i>Astrophytum myriostigma v. Monstrosa cv. Lotus Land</i>			
апикальні	1	26	73
медіальні	6	38	54
базальні	21	42	37
НІР ₀₅	2	4	3
<i>Sclerocactus spinosior ssp. Blanei Schlesi</i>			
апикальні	4	-	96
медіальні	14	9	77
базальні	67	31	2
НІР ₀₅	4	-	3

* повільний морфогенез – тривалість формування бруньок понад одного місяця

Наприклад, з ростом верхівкової бруньки гальмується ріст і розпускання бруньок, розташованих нижче неї. Таке явище пов'язане з тим, що ауксин синтезується у верхівковій бруньці і пересувається у бокові в недостатній кількості, що зумовлює утворення в них інгібітору росту – етилену, і вони не розпускаються. Якщо видалити верхівкову бруньку, ауксин починає синтезуватися в бокових бруньках у оптимальній кількості, а тому вони розпускаються і ростуть [19].

Ймовірно, що після поділу пагона вихідної донорної рослини, в якій ауксини і цитокиніни розподіляються нерівномірно, отримані живці мають різні гормональні статуси. Тому верхівка має багато ауксинів і мало цитокинінів, а живець з базальної частини, навпаки, містить в надлишку цитокиніни. Для підтвердження цього провели такий дослід (табл. 2.6).

При МКР хости сорту “Гіацінтіна” методом накладання вирощували три типи регенерантів із сегментів денця (живців) із апікальними, медіальними та базальними бруньками (рис. 2.25) на двох типах середовищ за кількістю екзогенних цитокинінів: БАП в концентраціях 1,0 і 2,5 мг/л.

Висота рослин зменшувалася з 23 до 12 мм. У них також відсутнє коренеутворення. Відсоток рослин з ознаками вітрифікації сягав 78. Тобто проявляється ефект, подібний до впливу надлишкових концентрацій речовин з фітотоксичною активністю. Менш вираженим було пригнічення живців апікального походження. Майже без змін відбувався розвиток регенерантів з медіальних живців при невисоких концентраціях БАП. Вирощування регенерантів на середовищах зі збільшеною концентрацією БАП – до 2,5 мг/л на 10-е субкультивування зумовлювало, хоча і в різній мірі, пригнічення розвитку регенерантів. Особливо це спостерігалось щодо розвитку рослин, регенерованих з базальних живців. Кількість вітрифікованих рослин у цьому варіанті становила 93 %. Лише 30 % рослин можна було живцювати. Решта рослин були непридатними для мультиплікації. Тобто припускаємо, що в них значно зріс цитокініновий статус, аж до різкого прояву фітотоксичної дії.

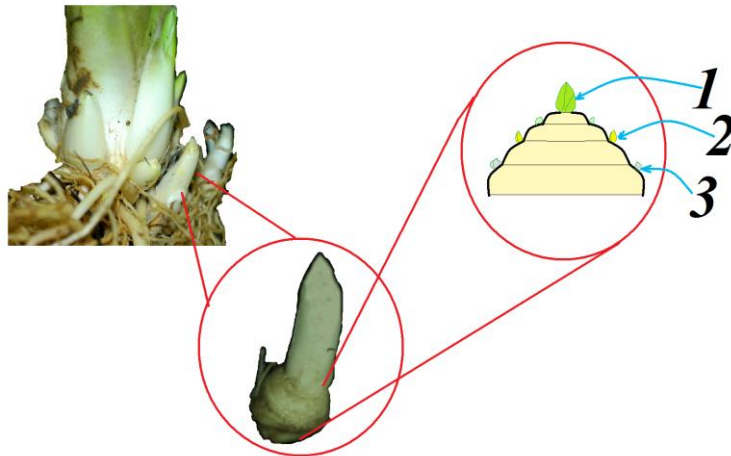


Рис. 2.25. Типи експлантів хости із сегментів денця (живців) з апікальними (1), медіальними (2) та базальними (3) бруньками

Встановили, що за умови нижчої концентрації екзогенної речовини з цитокініноюю активністю пригнічення регенерації після 10 послідовних субкультивувань відбулося в більшій мірі у регенерантів базального походження (рис. 2.26).

Ще одним підтвердженням накопичення та передавання посиленого цитокінінового статусу є дослідження, в яких вихідні для живцювання рослини вирощували на середовищах з високим умістом цитокінінів. Це своєрідна детермінація розвитку регенерантів індукцією (підготовкою) материнської рослини. Тобто, гормони застосовували не в процесі отримання регенерантів із живців, а за умови індукування вихідних для живцювання рослин. Контролем були вихідні рослини, вирощені на середовищі без додавання гормонів. Розвиток регенерантів із експлантів, ізольованих з індукованих вихідних рослин на середовищі без цитокінінів, був подібним до регенерантів, які росли на середовищі з цитокінінами, але були ізольовані із контрольних рослин [20, 81].

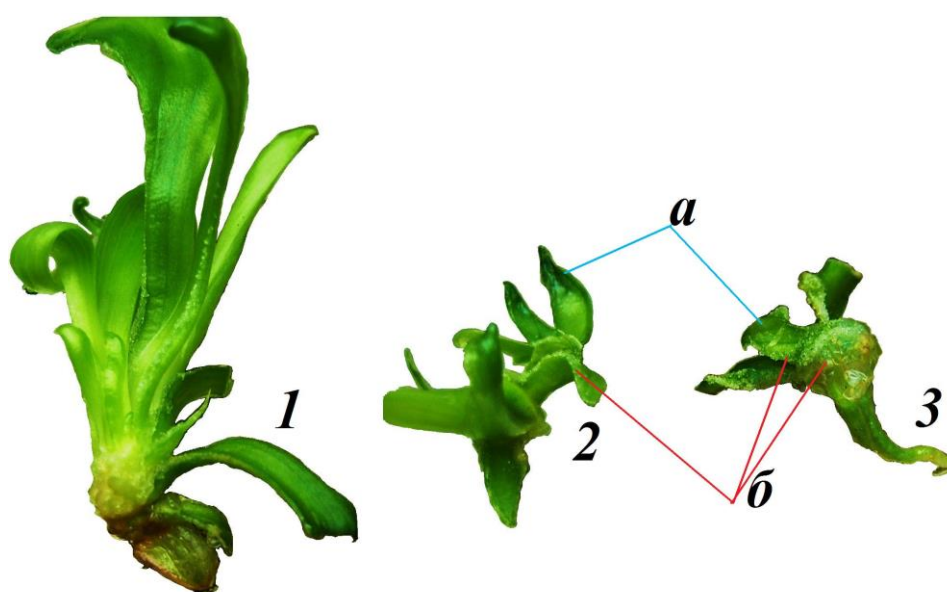


Рис. 2.26. Фітотоксичний прояв високої концентрації БАП (5 мг/л) в штучному живильному середовищі, хоста, сорт Гіацинтіна:
 1 – медіальні живці 10 пасаж , 1 мг/л БАП; 2 – медіальні живці 10 пасаж , 2,5 мг/л БАП;
 3- базальні живці 10 пасаж, 1 мг/л БАП; а – вітрифікація; б – калюсоутворення.

Таблиця 2.6.

Розвиток регенерантів хости на 30 день культивування залежно від походження експлантів та концентрації БАП (сорт Гіацинтіна)

Тип живців	БАП, мг/л	Висота рослин, мм		Довжина кореневої системи, мм		Коефіцієнт розмноження		Вітрифікованих, %	
		Пасаж							
		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±0,5	3,0±0,3	2,8±0,4
	2,5	44±5	31±6	21±3	3,0±0,5	4,9±0,6	4,9±0,6	5,0±0,7	39±7
базальні	1	37±3	18±4	11±2	0	1,4±0,3	1,4±0,3	2,0±0,5	78±6
	2,5	23±4	12±3	0,4±0,2	0	0,9±0,4	0,9±0,4	11±3	93±7

Отже, встановлений прояв надлишкової дії речовин з цитокініновою активністю в регенерантах базального походження за умови живцювання методом накладання. Посилує цей процес додавання в живильне середовище високих концентрацій екзогенних синтетичних цитокінінів.

Щодо різноякісності живців (експлантів), розміщених у різних ярусах рослини, є дані [224], які підтверджують наші припущення з приводу різного вмісту гормонів у донорних рослинах. Фітогормональний статус живців різний за вмістом ауксинів і гіберелінів, оскільки саме ці групи фітогормонів стимулюють ріст стебла [148]. Встановлено чіткий градієнт вільної ІОК, пов'язаний із їхнім зональним розподілом. Найвищий вміст цього фітогормону та гібереліну виявили в апікальній зоні стебла та найменший в базальній [183].

Зниження вмісту фітогормонів у базальній частині рослини, ймовірно, пов'язане з процесом старіння. Відомо, що для молодих листків характерний високий уміст ауксинів, який знижується після призупинення росту, а старіння листків супроводжується зниженням умісту гіберелінів [147].

Отже, асинхронність розвитку регенерантів значною мірою пов'язана з різним гормональним статусом експлантів ізольованих з різних частин паногона рослини-донора.

2.7. Вплив способів живцювання та кількості субкультивувань на регенерацію рослин хости з експлантів

МКР хости відбувається прямим морфогенезом – шляхом активації пазушних бруньок. Найпростішим способом є розділення куща на окремі пагони з двома-трьома листками (рис. 2.27). 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 такого методу є те, що для отриманого матеріалу не властивий синхронний розвиток. Асинхронність ускладнює як МКР хости, так і постасептичне дорощування.



Рис. 2.27. Кущ *in vitro* хости перед поділом

Це, як і в інших культур, пов'язано з онтогенетичною різноякісністю живців (бруньок) та корелятивними зв'язками [19, 20, 96].

Складним у хости також є поділ куща, оскільки часто пошкоджуються точки росту. Тобто утворене черешками листків несправжнє стебло та точка росту відрізається від стебла-денця. Тому було випробувано два прийоми зняття апікального домінування: вкорочення листків, які вкривають стебло та розрізання денця (рис. 2.28).

У контролі (табл. 2.7.), залежно від сорту, період між субкультивуваннями становив від 69 днів у сорту “Гіацінтіана” до 120 днів у сорту Паульс глорі. Вкорочення листків на сортах “Паульс глорі” та “Патріот” зменшувало період між субкультивуваннями до 84 та 103 днів відповідно, а у сорту “Гіацінтіана”, навпаки, відмічалось збільшення його тривалості, але в межах похибки.

У варіанті, що передбачав поділ денця період між субкультивуваннями скорочувався в рази. Так в сорту “Паульс глорі” з 120 до 23 днів, “Гіацінтіана” – з 79 до 20 днів. Кількість живців (коефіцієнт розмноження) також була більшою у цьому варіанті. Тобто кожне наступне субкультивування можна проводити через 23-30 днів.

Розмноження хости запропонованим способом потребує менших культуральних ємностей та знижує затрати електроенергії на отримання експлантів, хоча, як показує наш практичний досвід, отримані таким методом рослини перед висадкою в теплицю потребують додаткового культивування впродовж 20-45 днів на середовищах для укорінення.

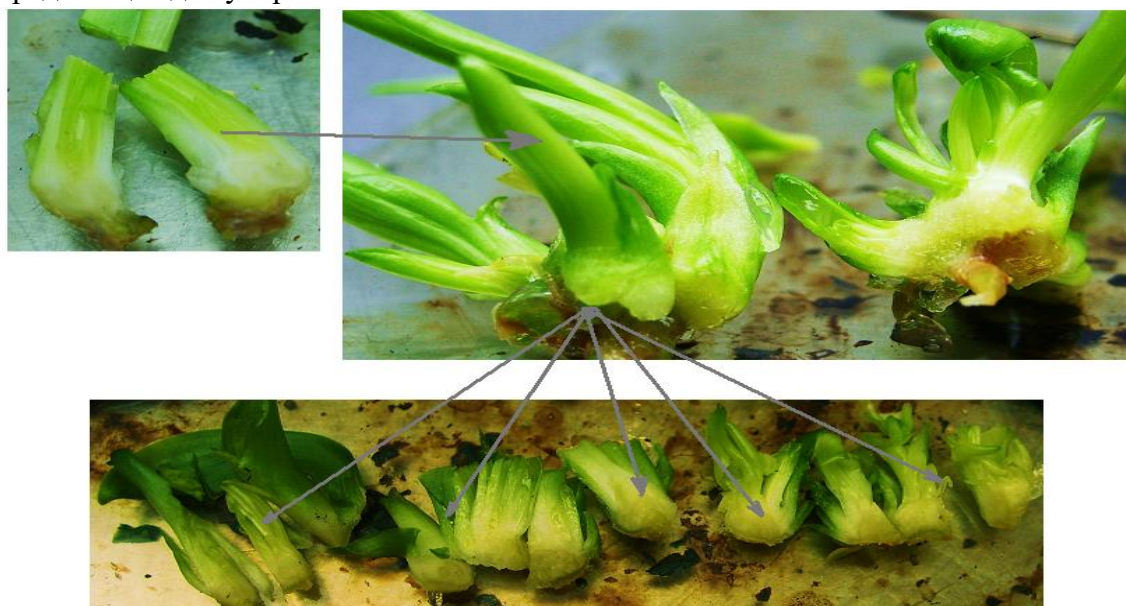


Рис. 2.28. Зняття апікального домінування поділом денця, сорт Гіацінтіана

Таблиця 2.7

Вплив способів зняття апікального домінування за МКР хости

Варіант	Сорти					
	Гіацінтіана		Паульс Глорі		Патріот	
	Період культивування, днів	Коефіцієнт розмноження	Період культивування, днів	Коефіцієнт розмноження	Період культивування, днів	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 ₀₅	8	0,2	5	0,3	6	0,2

Збільшення кількості живців з одного куща та скорочення періоду між субкультивуваннями (пасажами) дозволило підвищити вихід дочірніх рослин з вихідної. Наприклад, у сорту “Паульс Глорі”, при простих теоретичних розрахунках де 4,7 коефіцієнт розмноження, а 10 – кількість пасажів отримаємо $4,7^{10}$ * рослин.

На період між субкультивуваннями, незалежно від пасажу впливали й сортові особливості. Зокрема, серед досліджуваних сортів найкоротші періоди відмічені за 8 пасажу у сортів “Патріот” – 20 днів та сорту Гіацінтіана – 21 день. Найдовший – у сорту “Халціон” – 29 днів.

Під час введення у дослідження нових сортів спостерігалися зміни в періоді між послідовними живцюваннями (табл. 2.8.). Виявлена специфічна реакція сортів на тривалість субкультивування. При першому з них різниця між сортами становила 27 днів. Із збільшенням кількості субкультивувань ця різниця зменшувалася і при за 8-му субкультивуванні становила лише 9 днів.

Таблиця 2.8

Вплив кількості субкультивувань на період регенерування поділом денця, днів

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 ₀₅	2	3	4	3

Для більшості сортів: “Паульс глорі”, “Халціон” і “Гіацінтана” істотною виявилася різниця до п'ятого субкультивування, а в сорту “Патріот” – до четвертого.

2.8. Регенерація первинних експлантів та субкультивування *Agapanthus*

Через високий рівень контамінування шляхом прямого морфогенезу складно ввести в асептичні умови шматками кореневища або пагона, які містять бруньки для регенерування рослин агапантуса. Тому більш ефективним шляхом вирішення проблеми є отримання адвентивних бруньок із основи суцвіття в місцях прикріплення оцвіттини до квітколоже. Ми встановили неоднаковий хід регенераційного процесу залежно від походження експлантів.

Під час культивування ізольованих експлантів листки оцвіттини квітки із вкороченою оцвіттиною і основа суцвіття збільшувалися в розмірах та набували зеленого забарвлення (рис. 2.29). У їхній основі закладалися бруньки (як квіткові, так і вегетативні). Також розросталося й квітколоже (рис. 2.30). Однак, утворення пагонів із таких бруньок відбувалося повільніше, як порівняти з бруньками, що утворилися в основі суцвіття. Крім цього, частина експлантів набувала ознак вітрифікації. Водночас із основи суцвіття утворювався один, рідше два регенеранти, тоді як на експлантах квіткового походження формувалося 5-9 регенерантів (рис. 2.31), а інколи до 20 шт. У першому випадку рослини були більших розмірів та утворювали дочірні рослини. У другому – регенеровані рослини були меншими та щільно розміщеними одна біля одної.

При субкультивуванні *in vitro* встановлено вплив віку рослин донорів експлантів на ефективність регенерації із них рослин (рис. 2.31, табл. 2.9.). Використання донорів-експлантів віком 30 і 45 днів зумовлювало низьку приживлюваність – в межах 27-58%. За висотою пагона регенеранти цих варіантів різко відрізнялися від рослин, ізольованих із 90-денних донорів.

У сорту “Charlotte” висота регенерантів із донорів віком 90 днів становила 82 мм проти 16 і 18 мм у регенерантів із віком 30 і 45 днів відповідно.



Рис. 2.29. Розростання оцвітчини квітки *Agapanthus umbellatus*

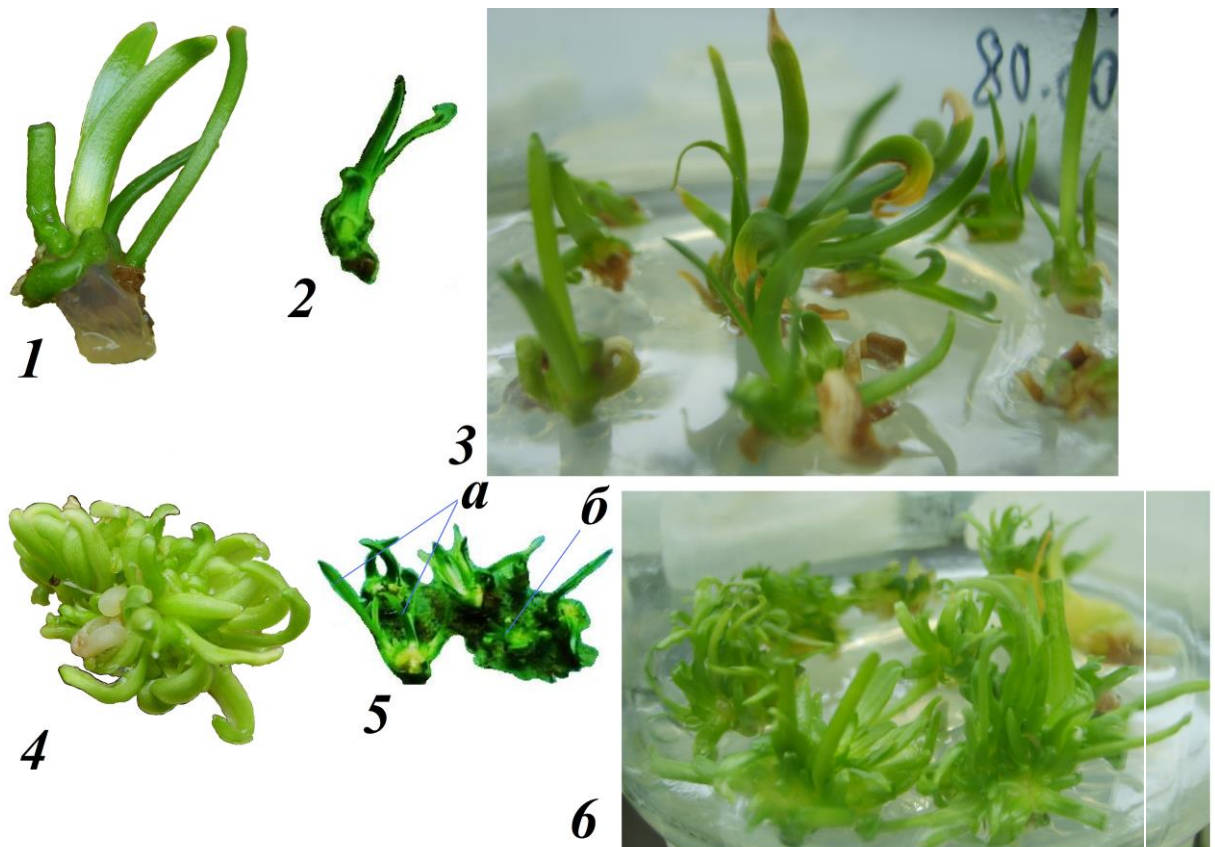


Рис. 2.30. Особливості утворення регенерантів залежно від походження первинних експлантів: 1. проліферація пагонів із основи суцвіття; 2. мікророслина; 3. дорощування мікророслин; 4. розростання квіток в умовах *in vitro*; 5. проліферація суцвіть, а – листки, б – оцвітчина; 6. дорощування конгломератів мікророслин.

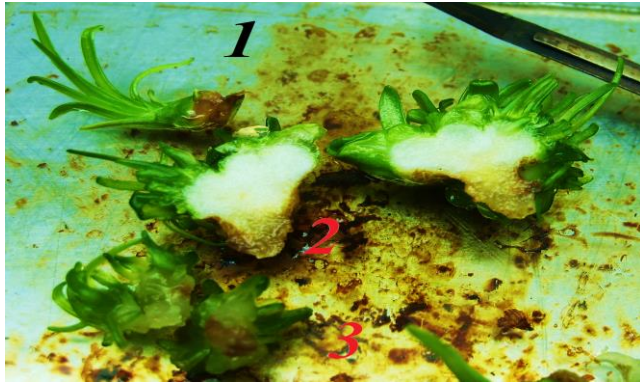


Рис. 2.31. Утворення первинних регенерантів *Agapanthus umbellatus* із експлантів на 45 день культивування: 1 регенеранти із основи суцвіття; 2 регенеранти із квітки; 3 вітрифіковані регенеранти із квітки

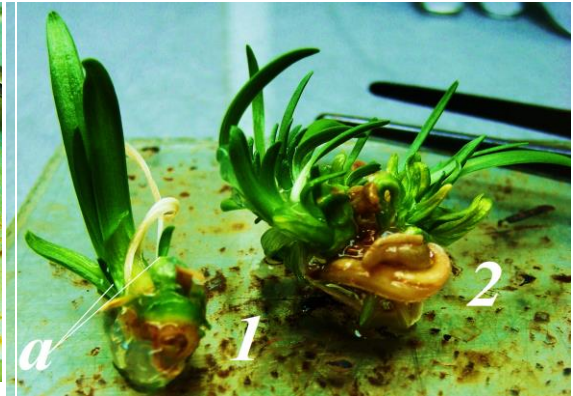


Рис. 2.32. Утворення первинних регенерантів *Agapanthus umbellatus* із експлантів на 90 день культивування: 1 регенеранти із основи суцвіття; 2 регенеранти із квітки; а – утворення дочірних рослин



Рис. 2.33. Вплив віку вихідних рослин на приживання ізольованих мікропагонів, де: 1. 30 днів 2. 45 днів 3. 90 днів.



Таблиця. 2.9

Вплив віку рослин-донорів експлантів на приживання та морфогенез регенерантів

Вік рослин-донорів, днів	Прижилось експлантів, %	Висота пагона, мм	Кількість пагонів в кущі, шт.
<i>Сорт Charlotte</i>			
30	27	16	1,1
45	45	18	1,3
90	98	82	3,2
<i>Сорт Black magic</i>			
30	31	27	1,2
45	58	63	1,3
90	100	107	3,6

2.9. Модифікаційні зміни при вирощуванні *in vitro*

Рослини, які вирощуються *in vitro*, зазнають значного впливу специфічного зовнішнього середовища, що спричиняє модифікаційні зміни у них. Останні за період тривалого культивування можуть переходити в епігенетичні. Ці зміни нетипові для рослин *in vivo*, а тому, зберігаючись тривалий час у пробірковій культурі, вони часто зумовлюють значні відхилення в рості та розвитку рослин. Окремі вчені вважають, що негативні наслідки тривалого культивування *in vitro* повинні бути знівельовані шляхом пересадки пробіркових рослин в умови *in vivo*. Частота таких операцій може бути з інтервалом у 5-8 років.

Попри усі зусилля експериментатору не вдається повністю відтворити природні умови у штучному середовищі. Це стосується всіх складових росту рослин: мінеральне живлення, світло, склад повітря, його вологість тощо. Використовуючи спеціальні заходи, можна лише наблизити умови штучного середовища до природних. Щодо комплексу специфічних речовин використовують компоненти природного середовища: кокосове молоко, витяжка з бульб картоплі, зерен кукурудзи тощо. Комбінуючи лампи різного спектру, можна наблизити штучне світло до природного, але слід враховувати поглинання певної частини світлових хвиль, склом пробірок, склянок. Це ж стосується інших складових середовища *in vitro*.

Які ж найбтиповіші зміни відбуваються в пробіркових рослин та чим вони спричинені? Експериментатори справедливо започаткували дослідження з культивування *in vitro* з **підбору живильного середовища**. Відповідно до вимог певних культур, його вміст суттєво відрізняється від типових, запропонованих вченими. Це стосується співвідношення форм азоту, вмісту в середовищі цукрози, вітамінів, фізіологічно активних речовин, різних добавок. Викладене також відноситься до різного матеріалу однієї і тієї ж культури. Наприклад, для вирощування меристем картоплі використовується дещо інший склад живильного середовища, проти того, що застосовується для розмноження живцями.

При культивуванні частин або цілих рослин в умовах *in vitro*, де достатня розрахункова кількість основних елементів живлення, деякою мірою порушується пріоритетність розвитку **кореневої системи**, як порівняти з частиною рослин, що знаходиться над середовищем. Адже все, що необхідне, рослині для росту знаходиться в доступній формі і високих концентраціях.

Тому, на перших етапах росту коренева система пробіркових рослин розвивається слабо. Коли для рослини вичерпується запас поживних речовин, зменшується вміст вологоги вона стає розростається і вбирає всі залишки елементів живлення середовища. Спочатку коренева система *in vitro* формується з первинних нерозгалужених корінців, які не мають корневих волосків і характеризуються білим кольором. Пізніше утворюються відростки від основних корінців.

Недостатньо розвинена коренева система пробіркових рослин одна з основних проблем постасептичної адаптації. Такі рослини погано приживаються на етапі *in vitro* - *in vivo* у процесі пересаджування їх у ґрунт.

Зовсім інший, ніж у природних умовах, **склад повітря *in vitro***. Уже в процесі введення матеріалу в культуру склад повітря видозмінений. Викладене стосується повітря боксів, де відбувається садіння, повітря біля спиртівки або іншого приладу для підтримання стерильних умов під час переміщення матеріалу у пробірку.

Ще більшою мірою змінюється склад повітря *in vitro* під час культивування рослин. Вони постійно відчувають дефіцит вуглекислого газу, який необхідний для проходження фотосинтезу [179, 185]. Адже того, що виділяється рослинами в процесі дихання недостатньо для росту рослин. Можливим варіантом виходу із ситуації є введення в пробіркову культуру додаткової кількості вуглекислого газу. Проте, зважаючи на необхідність дотримання стерильності та з інших технічних причин, цей метод зміни складу повітря в пробірковій культурі раніше не знаходив поширення. Він є ефективним за збільшенням освітленості [203]. Водночас, було отримано дані про відсутність позитивного впливу на інтенсивність фотосинтезу, збільшення концентрації вуглекислого газу у рослин *in vitro* червоної малини [120], хоча в рослин цього варіанту поліпшувалася життєздатність після пересаджування.

Доведено, що зменшення концентрації в середовищі цукрози підвищує швидкість фотосинтезу. В дослідях К. Wardle та інших [222], у культивованих рослин кольорової капусти без сахарози інтенсивність фотосинтезу була на 15% більшою, ніж на середовищі з 3% сахарози.

Вважаємо, що зниження інтенсивності фотосинтезу через відносно низьку концентрацію вуглекислого газу спричиняє темно зелене забарвлення листків, стебел. Це пояснюється збільшенням кількості хлорофілу. У природних умовах відтінки зеленого кольору листків, стебел можуть бути найрізноманітнішими.

Крім зниження концентрації вуглекислого газу, в пробірковій культурі спостерігається накопичення шкідливих газів: етилену, етанолу, ацетат альдегіду та інших [198], які негативно впливають на ріст більшості рослин.

У наших дослідях виявлені такі ознаки отруєння рослин *in vitro*: листки, починаючи з нижніх, стають світло-жовтими, потім набувають забарвлення подібного до старого газетного паперу. Потомство від таких рослин має вкорочені, дещо потовщені пагони, майже всі листки хлорозні (рис 2.34).



Рис. 2.34. Отруєння етиленом регенерантів ожини:
зліва - другий пасаж; праворуч - перший пасаж.

При тривалому отруєнні в листках з'являються прозорі ділянки між жилками, які потім, зливаючись, займають усю площу листка. Пазушні бруньки спочатку зелені, але за умови глибокого отруєння стають кремово-жовтими і, подібними до листків, відмирають. При неглибокому отруєнні рослин у контрольному варіанті впродовж 1-1,5 місяця вони повільно відновлювалися. Тому нами розроблено середовище, яке передбачало застосування інгібітора етилену - нітратного срібла в кількості 3 мг/л.

Інші дослідники [221] вважають, що для усунення негативного впливу на рослини шкідливих газів можна використовувати їхню взаємодію з конденсованою фазою. Крім цього, пропонується регулювати газообмін через нещільне закривання пробірок пробками або вставляти газопроникні фільтри зверху [186, 221], а також продування пробірок вуглекислим газом [3].

Значні зміни при культивуванні *in vitro* щодо повітряного обміну між рослинами та оточуючим середовищем пов'язані із функціонуванням **продихового апарату**. Висока вологість повітря в пробірках, склянках - до 85% обумовлена випаруванням води рослинами, середовищем. Саме це спричиняє відсутність необхідності регулювання водообміну рослин, а тому продихи у пробіркових рослин постійно відкриті. Модифікаційні зміни в роботі продихів настільки значні, що не реагують на речовини, що викликають водяний стрес, наприклад, абсцизову кислоту. Аналогічне спостерігається в умовах індукованої етіоляції [138].

Порушення в функціонуванні продихового апарату особливо негативно відбивається на адаптивній здатності пробіркових рослин на етапі *in vitro-in vivo*. Згідно з даними Реуцького В.Г та ін. [138] швидкість водовіддачі у рослин *in vitro* в першу добу після їх вивільнення з пробірки в два рази більша, ніж у контролі, і лише на 5-у добу величина показника стає близькою до контролю. Це пов'язано з відсутністю контактів водної фази міжклітинників та клітин, що також є значними модифікаційними змінами, що зумовлені вирощуванням пробіркових рослин у специфічних умовах.

Значні зміни при культивуванні *in vitro* відбуваються з процесами гідратації. Доведено [138], що її швидкість у пробіркових рослин становить біля 0,012 мкл/хв., а в контролі величина показника сягала 0,105 мкл/хв.

Модифікаційні зміни в пробіркових рослин, пов'язані з високою вологістю повітря, зменшеним умістом вуглекислого газу, можна деякою мірою нівелювати, що поліпшує ріст рослин, коренеутворення, життєздатність та раннє настання процесів росту [190].

Зміни в рослин *in vitro* також стосуються **дисфункцій верхнього кінцевого двигуна**, тобто клітини мезофілу листка не здатні генерувати пересування рідини по клітинах ксилеми. Більшу частину води пробіркові рослини отримують безпосередньо з повітря, яке значно насичене нею, а також завдяки симпластному транспорту. Цим рослини *in vitro* значною мірою відрізняються від *in vivo*.

Інші відхилення, які зустрічаються при культивуванні *in vitro*, зумовлені змінами обводненості пробіркових рослин. У багатьох культур нами відмічено появу регенерантів із ознаками гіпергідратації, яку ще називають вітрифікацією або склянінням. На нашу думку, природа цього явища може бути на нашу думку багатовекторною. Поряд із обводненням спостерігаються й супутні ознаки. Це, зокрема, забарвлення від блідо-жовтого до темно-зеленого з різноманітними відтінками, від водянисто-прозорого до чорно-фіолетового.

Діагностування природи проблеми вітрифікації і швидке усунення помилок або коригування технологічного процесу є надзвичайно важливим із комерційної точки зору. Тому нами змодельовано на трьох ягідних культурах: ожина, сорт “*Reuben*”; малина, сорт “*Octavia*”; смородина червона сорт “*Jonkheer Van Tets*”, умови, через які теоретично може виникати гіпергідратація:

1. живцювання дуже молодих рослин-донорів живців (15-20 днів);
2. застосування високої концентрації цитокиніну – БАП (2 мг/л для ожини і смородини червоної та 4 мг/л для малин);
3. надлишок азоту: вміст NH_4NO_3 в середовищі збільшено в 2,5 рази, як порівняти із прописом MS;
4. збільшення у тричі вмісту хелатної форми заліза;
5. культивування на кислому середовищі (рН 5,0);
6. загущена вдвічі, як порівняти з контролем, посадка живців.

У контрольному варіанті висаджували по 5 живців в 200 мл культуральну ємність з живильним агаризованим середовищем MS з додаванням 0,5 мг/л БАП (для малини 2,0 мг/л), 0,1 ІМК, рН 5,6.

У варіанті з використанням молодих донорів регенеранти всіх трьох культур, у порівнянні із контролем, мали такі ознаки: пагін короткий, товстий, за 1-2 місяці сформувалося одне-два, рідше три, міжвузля; верхівкова брунька зелена, нормальних розмірів, інколи потовщена; коренева система відсутня; в базальній частині пагона є наплив або незначне калюсоутворення, калюс зеленого кольору; уся рослина інтенсивно зеленого смарагдового кольору. Регенеранти після пересадки без живцювання на контрольний варіант через місяць набувають нормального стану.

За умови посадки на середовище із високим вмістом цитокинінів (БАП) регенеранти утворюють конгломерат дрібних пагонів (рис. 2.35). Ці пагони мали тонке стебло та дрібні листки. Колір рослини загалом зелений із салативим відтінком. Із кожним наступним пасажем розміри рослини зменшувалися, кількість мікропагонів у перші пасажі зростала, але після 2-3 пасажу зменшувалася. Також ставало світло-салатовим забарвлення листкових пластинок. Після садіння на контрольне середовище в одних рослин через 10-15 днів, в інших – на наступний пасаж зникли ознаки гіпергідратації.

За умови садіння на середовище з надлишком азоту, рослини, як і в попередніх варіантах, були вітрифіковані але мали свої характерні властивості. Так, у нижніх листків листкова пластинка була більша, порівнюючи з контролем, темно-зелена, в деяких рослин – із темними крайовими некрозами. Верхні 2-3 міжвузля спочатку були салативого кольору, прив'явлі. Потім вони жовтіли, в'яли і відмирили. Тобто спостерігалися типові ознаки пов'язані, із ускладненим засвоєнням міді [19]. Після садіння в контролі із пазух нижніх листків відростали звичайні пагони.

За умови садіння живців на середовище із підвищеним умістом заліза регенеранти мали інтенсивно зелений колір, окремі – дещо збільшену куцистість та гіпергідратовані тканини. За висотою пагона вони майже не поступалися контрольним. У наступних пасажах утворювалися вкорочені рослини з формуванням в базальній частині пагона калюсного напливу. До надлишку заліза регенеранти малини були менш сприйнятливі, а смородини червоної – більш сприйнятливі. Ожина займала проміжне положення.

Живці, висаджені на «кисле» середовище (в цьому варіанті – рН 5,0, а в контролі – 5,6), регенерувались невеликі рослини із 2-3 міжвузлями (рис. 2.36). Висота регенерантів, коли порівняти із контролем, була в два-три рази менша.

У нижніх листків через погане засвоєння фосфору і калію [34] листкові пластинки були звичайних розмірів, темно-зелені із червоними та фіолетово-синім відтінками. Тобто забарвлення, типове для нестачі Р і К [19]. Верхівкові листки були дрібними, часто вузькими, світло-зеленими. У багатьох листків через погане засвоєння кальцію відмирили верхівки [19]. З причини втрати апікального домінування за таких умов з пазух нижніх листків проростали дрібні пагони. Згодом з часом також відмирили верхівки.



Рис. 2.35. Вітрифікація, викликана надлишком в живильному середовищі БАПу (ожина “Рубен”)



Рис. 2.36. Вітрифікація, викликана кислим середовищем (регенерант смородини червоної)

В усіх варіантах відзначено біологічні особливості реакції того чи іншого виду рослини на фактори, що викликають гіпергідратацію тканин. За нашими спостереженнями, для таких культур як яблуня, троянда, кизил встановлено, що скорочення освітлювального періоду до 6 і менше годин на добу спричиняє різке зростання етиленового отруєння. Якщо ж при нетривалій дії освітлення довести до 20-24 годин, у 75-90% регенерантів можна відновити нормальний ріст і розвиток. Розміщення старих регенерантів яблуні поруч із іншими культурами також може бути причиною надлишкової дії етилену.

III. ГОРМОНАЛЬНА ДЕТЕРМІНАЦІЯ ОНТОГЕНЕЗУ *IN VITRO*

3.1. Регулювання онтогенезу шляхом зміни донорно-акцепторних відносин між органами рослини при культивуванні *in vitro*

На регенерацію рослин у процесі МКР, крім різноякісності експлантів, пов'язаною з розміщенням вихідних живців на материнській рослині, важливе значення мають трофічна регуляція, індукуючий вплив хімічних та фізичних факторів, календарний вік рослини-регенеранта. Тобто ці фактори впливають на надходження речовин до рослини, їхній рух у ній. Залежно від прояву трофічних, гормональних факторів культивування змінюється активність акцепторів та донорів пластичних речовин у рослині і, як наслідок, відбуваються морфологічні зміни.

Вплив календарного віку рослини-донора експлантів на МКРР. З віком у рослинах-донорах експлантів змінюється кількісний та якісний склад гормонів, що відбувається на розвитку регенерантів із ізольованих експлантів. Наприклад, у наших дослідженнях під час живцювання *in vitro* рослин картоплі з віком 15, 30, 50 і 80 днів відмічено найбільший приріст стебла в регенерантів із 80 денних рослин (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Розвиток рослин-регенерантів залежно від періоду повторного живцювання

Сорт	Вік вихідних рослин, днів	Висота регенеранту, мм		Кількість живців, шт.		Розвиток кореневої системи, бал		Розвиток листової пластинки, бал	
		7 день	14 день	7 день	14 день	7 день	14 день	7 день	14 день
“Серпанок”	30-32	24,3	35,4	3,2	9,4	2,2	4,9	3,4	4,2
	50-55	27,9	36,3	3,1	8,7	2,1	5,0	3,3	4,3
	75-80	32,1	47,4	5,4	12,4	3,2	3,1	2,1	3,6
	13-15	13,4	23,1	1,8	7,6	1,8	4,3	4,5	4,9
НІР ₀₅		2,7	6,0	0,5	2,0	0,4	0,6	0,7	0,9
S _{x̄} , %		1,1	1,2	2,0	1,5	1,6	1,5	2,9	3,2
“Слов’янка”	30-32	20,7	34,3	2,9	8,9	2,0	4,8	2,5	4,0
	50-55	23,1	33,8	2,2	9,1	1,9	4,7	1,8	4,1
	75-80	47,2	55,6	4,6	10,8	3,0	3,3	4,1	3,0
	13-15	11,1	21,4	2,1	5,8	1,6	4,4	1,0	5,0
НІР ₀₅		9,2	8,4	0,4	1,3	0,6	0,4	2,4	1,2
S _{x̄} , %		0,8	0,9	1,3	1,1	1,7	1,9	4,7	3,9
“Повінь”	30-32	28,4	44,7	4,5	8,4	3,1	5,0	4,5	4,7
	50-55	29,9	46,0	4,4	8,6	3,2	4,9	4,5	4,8
	75-80	56,3	49,1	6,3	4,6	3,9	4,0	1,8	3,2
	13-15	21,4	32,1	3,4	7,3	2,4	4,7	5,0	5,0
НІР ₀₅		4,8	6,7	0,7	1,7	0,7	1,2	1,0	0,8
S _{x̄} , %		0,7	0,9	1,5	1,5	2,0	2,0	3,2	3,2

Порівняно з іншими варіантами, такі регенеранти мали тонке стебло, видовжені міжвузля, більшу кількість листків, яким властива мала листовая пластинка. Найповільніше регенерація проходила в живців з рослин вік яких становив 15 днів. Ці регенеранти формували товсте коротке стебло з меншою кількістю листків, але листки мали більші розміри [103], тобто відбувалася різна активація тих чи інших ділянок регенеранта.

Неоднаковий розвиток регенерантів із живців від різних за віком вихідних рослин зумовлений різним ступенем диференціації меристем та гормональним контролем їх онтогенезу [19, 114]. Так, за умови переважання в молодих рослинах ендо- та екзогенних цитокінінів утворюються товсті стебла та листки з більшим черешком і великою листовою пластинкою.

Припускаємо, що подовження міжвузлів пов'язане зі збільшенням вмісту гіберелінів, абсцизінів у 80-денних донорів, а великі листові пластинки утворювалися внаслідок високої концентрації цитокінінів та малої кількості абсцизової кислоти. Аналогічні дані були отримані з досліджень О.П.Таран, яка встановила вплив віку рослин *in vitro* та їх гормональної різноякісності в межах пагона [148].

Використання експлантів молодих живців не завжди давало позитивний ефект. Ми встановили це в процесі декількох субкультивувань методом накладання у живців туї західної віком 20 і 60 днів. У першому варіанті вже після третього субкультивування експланти втрачали здатність до ризогенезу, мали вкорочений пагін (рис. 3.1), а при п'ятому субкультивуванні морфогенез був відсутній взагалі і лише деякі експланти утворювали твердий, неморфогенний калюс. На противагу викладеному вище, експланти з материнських рослин віком 60 днів формували рослини-регенеранти із кореневою системою. Вони мали добре сформовані пазушні бруньки, із яких при живцюванні регенерувалися повноцінні пагони.



Регенеранти з експлантів, ізолюваних із материнських рослин віком 20 днів



Регенеранти з експлантів, ізолюваних із материнських рослин віком 60 днів

Рис. 3.1. Вплив віку материнських рослин-донорів експлантів на розвиток ренегенерантів туї західної

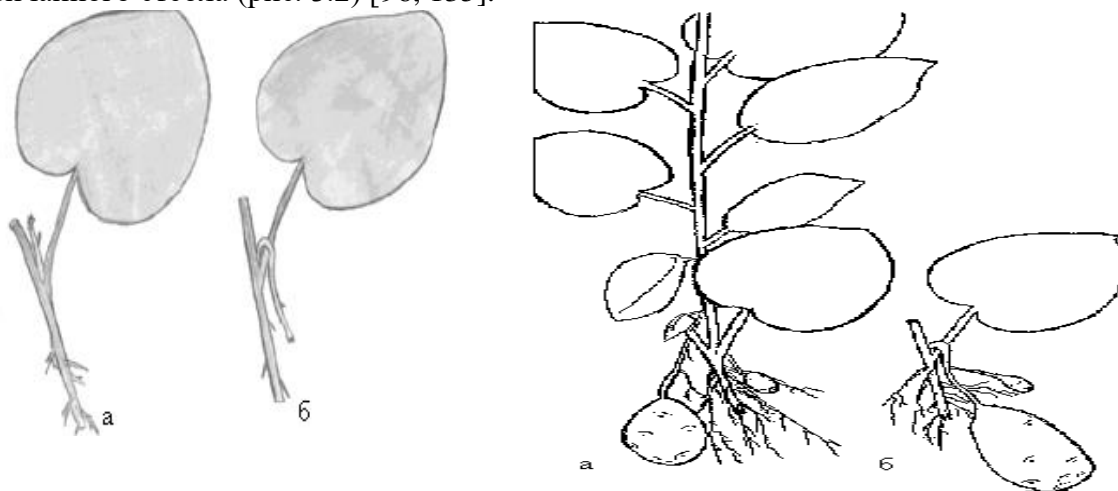
Ризогенез регенерантів від 60-денних рослин-донорів свідчить про те, що в материнських рослинах із віком стали іншими співвідношення гормонів, тобто змінився цитокінін-ауксиновий індекс в сторону ауксинів.

Використання донорами рослин віком 90 днів зумовлювали утворення слабозвиннутих регенерантів, у яких утворювалася лускоподібна хвоя, а в базальній частині пагона виділялися фенолоподібні речовини. Як зазначалося в попередніх розділах, це могло бути зумовлено втратою ювенільності.

Встановлено, що в живців, ізольованих зі старших за віком рослин картоплі, накопичується значна кількість гіберелінів та абсцизинів. Тобто в таких рослин гормональна система “підготувала хід метаболізму” (детермінувала) до столоно- та бульбоутворення [41, 103]. Однак якщо цим регенерантам створити умови, які не сприяють індукції бульбоутворення (довгий світловий день, низький вміст сахарози в живильному середовищі), формуються лише витягнуті рослини з невеликими листками.

Наприклад, за відсутності факторів, які індукують зміни в розвитку за МКР картоплі, живцювання в культурі впродовж 10-15 і більше років не спричинило втрат регенераційних властивостей [90]. Це пов’язано з тим, що культивовані рослини постійно знаходяться на ювенільному етапі органогенезу. Водночас при переході рослин *in vitro* в звичайні умови, ювенільність втрачається. Наприклад, живці з рослин *ex vitro* віком 20-40 днів нормально регенерували, а вже починаючи з віку в 60 і більше днів, регенерація різко вповільнювалася. Це пов’язано з дією індукуючих факторів в умовах *in vivo*, що призводили до переходу меристем пагонів (бруньок) вихідних рослин до генеративних етапів органогенезу [7, 96].

Однак, в *in vitro* можна створити певні умови, які індукуватимуть зміни в онтогенезі. Наприклад, на фоні високого вмісту в живильному середовищі сахарози (6-8%) та цитокинінів інкубація живців пониженими позитивними температурами індукує в бруньці живця відразу розвиток столона, бульби без утворення рослиною звичайного стебла (рис. 3.2) [96, 135].



Розвиток бруньки живця

Бульбоутворення

Рис. 3.2. Хід регенерації рослин з живців *in vitro*:

- а – контроль (вирощування живців за температури 18–26 °С);
- б – живці індуковані пониженими позитивними температурами.

Вплив хімічних та фізичних факторів на МКРР. Основними серед таких факторів виділяють: дію світла, температури та вплив різноманітних хімічних речовин. Зокрема, в картоплі на процес бульбоутворення, тобто зміну донорно-акцепторних відносин, впливають фактори фізичної та хімічної природи. Утворення бульб прискорює короткий фотоперіод, понижені позитивні температури, підвищена концентрація вуглеводів в клітинах, співвідношення фітогормонів та інших речовин, що регулюють ріст [139, 143]. Скоростиглість сорту та майже всі фактори, що прискорюють розвиток та вповільнюють ростові процеси, скорочують період вегетації та зумовлюють менші розміри рослини і меншу урожайність [19]. Подовжити період бульбоутворення може вирощування мікробульб у темноті або при освітленні лише в перші 7-10 днів, але за таких умов розміри бульб збільшуються [96].

Нами при вивченні впливу фізичного (термоіндукція¹) та хімічного (додавання в середовище хлорхолінхлориду 2 мг/л) факторів встановлено (рис. 3.3), що понижені позитивні температури і хлорхолінхлорид, як порівняти з контролем, обумовлюють скорочення періоду культивування рослин картоплі сортів “Подольянка” від 79,7 до 46,5 днів і сорту “Забавка”, відповідно, 89,4 і 49,2 днів. Дія цих чинників проявляється при застосуванні їх як окремо, так і сумісно.

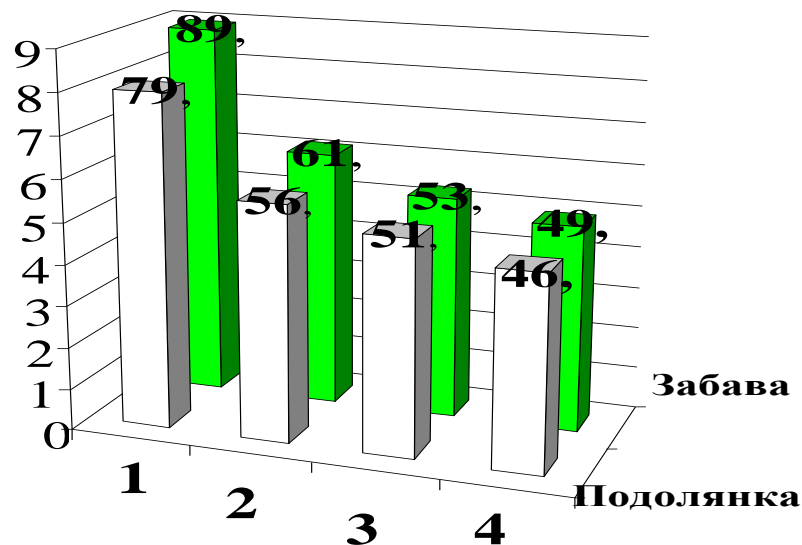


Рис. 3.3. Вплив хлорхолінхлориду та термоіндукції на період культивування рослин картоплі в умовах *in vitro*
 Варіанти: 1. Контроль, 2. Термоіндукція, 3. Використання хлорхолінхлориду, 4. Термоіндукція + хлорхолінхлорид

На нашу думку, обробка рослин *in vitro* пониженими температурами (термоіндукція) та додавання в живильне середовище хлорхолінхлориду викликає стрес. Більшість рослин у стресових умовах, як правило, прискорюють свій розвиток [19], а отже, і швидше формують бульби.

¹ Примітка: температура за термоіндукції становила від +2⁰С до +4⁰С та експозиції 4 доби.

Однак, прискорення процесів розвитку відбувається часто зі зниженням ростових процесів – зменшуються розміри рослин, кількість і розмір мікробульб.

Однак, згідно з отриманими даними, застосування термоіндукції, порівнюючи із контролем, прискорює утворення бульб *in vitro* і одночасно збільшує відсоток бульб розміром 8мм і більше (кондиційних [135]) у сорту “Подольянка” з 89,7% до 94,9% і в сорту “Забава” з 93,1 до 96,4% (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вплив хлорхолінхлориду та термоіндукції на бульбоутворення в рослин картоплі в умовах *in vitro*

Варіант	Сорт “Подольянка”		Сорт “Забава”	
	отримано мікробульб		отримано мікробульб	
	всього, шт.	у тому числі кондиційних, %	всього, шт.	у тому числі кондиційних, %
1. Контроль	112,3	89,7	124,7	93,1
2. Термоіндукція	117,4	94,9	121,3	96,4
3. Хлорхолінхлорид	97,3	64,1	102,4	65,9
4. Термоіндукція+ хлорхолінхлорид	104,1	61,0	94,8	67,4
НІР ₀₅	3,9		4,2	



Рис. 3.4. Особливості бульбоутворення *in vitro* за культури одного вузла

Нами також досліджено вплив хлорхолінхлориду та відсутності тривалого освітлення на отримання темнових мікробульб (“культура одного вузла”). Доведено, що, не зважаючи на подовження періоду культивування, збільшується як кількість, так і розміри бульб *in vitro* за умови отримання їх у темноті. Однією з причин цього при культивуванні картоплі *in vitro* за умови використання технології “культура одного вузла” на середовищах, збагачених сахарозою [96], може бути те, що фермент(ти), які синтезують крохмаль, мають найвищу активність у темноті [21].

Відмінністю в розвитку рослин при отриманні темнових бульб є те, що вони, стебла відразу формують столони та бульби, не утворюючи. Тобто акцептором вуглеводів із штучних живильних середовищ є лише бульба (рис. 3.4). Хлорхолінхлорид як за звичайної технології, так і при застосуванні “культури одного вузла” зменшує кількість бульб і їхні розміри. Однак, за цих умов скорочується період культивування і отримання темнових мікробульб (рис. 3.5).

Отже, термоіндукція рослин картоплі *in vitro* прискорювала утворення бульб і збільшувала відсоток кондиційних мікробульб. Додавання 2мг/л хлорхолінхлориду у живильне середовище також прискорювало бульбоутворення, однак бульб утворювалося менше і з нижчим відсотком кондиційних. Вирощування мікробульб за технологією “культури одного вузли” подовжує період культивування, але одночасно збільшується продуктивність рослин в умовах *in vitro*.

Тривалість освітлення. Світло є фактором, що детермінує перебіг онтогенетичних процесів у регенерантів. Порівнювали особливості регенерації експлантів міскантусу (*Miscanthus giganteus*) за умови освітлення від 8 до 24 годин на добу. Встановлено, що довший фотоперіод збільшує розміри регенерантів, але достовірно зменшує кількість пагонів: з 3,3 шт. при цілодобовому освітленні до 1,4 шт. за умови 8 годинного освітлення на добу (табл. 3.3). Зниження фотоперіоду з 24 до 8 годин на добу зумовлювало зменшення довжини кореневої системи регенерантів з 18,0 до 3,3 мм.

У дослідженнях із кактусами встановили вплив тривалості фотоперіоду на морфогенні властивості поділу регенерантів на живці (табл. 3.4). Триваліший освітлювальний період у обох видів індукував калюсогенез, хоча й в різній мірі. Зокрема, експланти *Sclerocactus spinosior ssp. blainei “schleseri”* в 78 % випадків формували калюси, при показнику 37% в *Astrophytum myriostigma v. monstroza cv. “Lotus Land”*.

Таблиця 3.3.

Вплив тривалості освітлювального періоду на регенерацію експлантів міскантусу на 50 день культивування

Освітлювальний період, годин на добу	Висота рослин, мм	Кількість пагонів, шт.	Довжина кореневої системи, мм	Прижилось рослин, %
24	75,0	1,4	18,0	97,0
16	63,0	1,6	13,5	96,0
12	54,5	2,5	4,8	91,0
8	46,5	3,3	3,3	88,7
НІР ₀₅	3,6	0,2	1,1	3,8

Тобто, *Sclerocactus spinosior ssp. blainei “schleseri”* був більш схильним до калюсоутворення. Скорочення тривалості освітлення стимулювало утворення точок росту, навіть в дедиференційованих калюсних тканинах (рис. 3.6), які в подальшому легко відокремлювалися і висаджувалися як окремі рослини або ділилися на живці-пагони.

Світлоносії. Світло – дуже потужний регулятор росту і розвитку. Багато процесів росту і розвитку, в тому числі перехід до спокою та старіння, регулюються світлом. Крім забезпечення енергією фотосинтезу світло виконує сигнальну та регуляторну функції [19, 114].

Із появою нових штучних світлоносіїв (“енергозберігаючих ламп”) постає питання можливості їх застосування на заміну традиційних люмінесцентних ламп типу ЛБ 40 або ЛБ 36. Нами порівняно особливості онтогенезу регенерантів картоплі *in vitro* та *ex vitro* при вирощуванні їх з освітленням лампами “ЛБ” та “Промінь”.

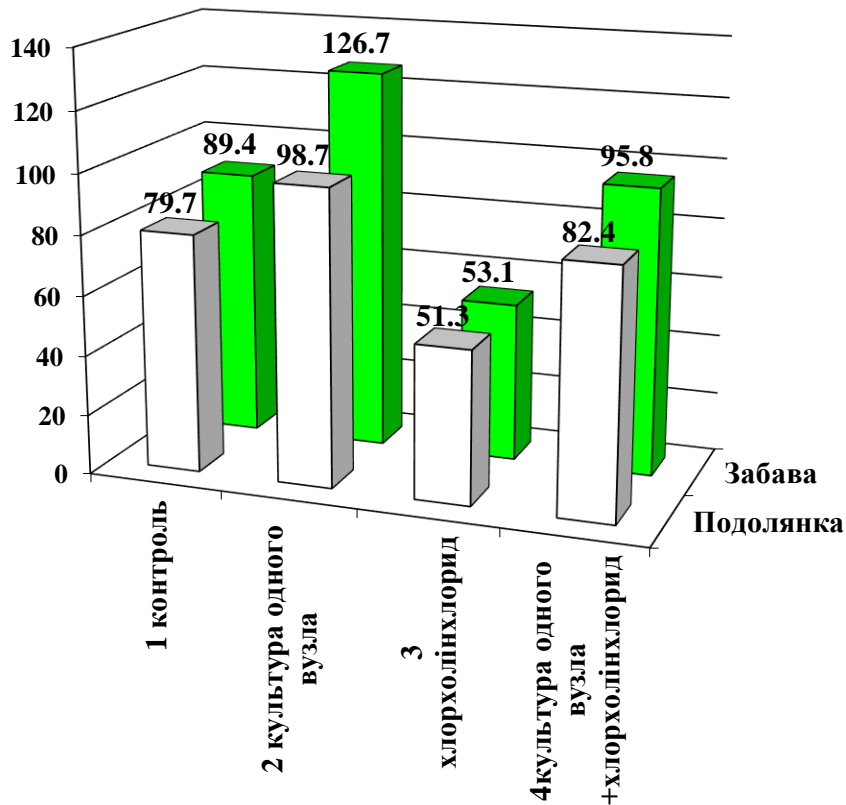
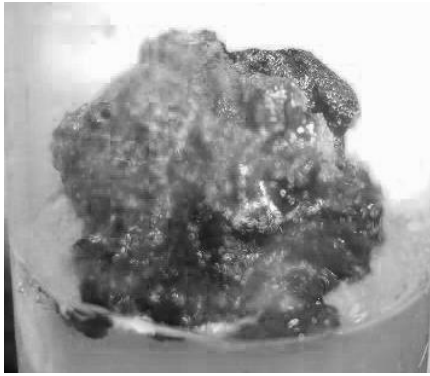


Рис. 3.5. Вплив хлорохолінхлориду та “культури одного вузла” на період культивування рослин картоплі в умовах *in vitro*, дні

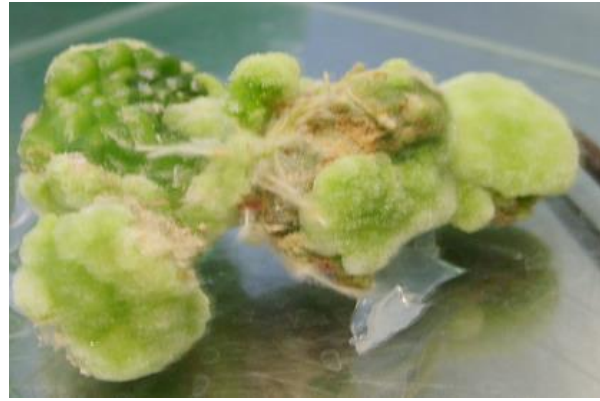
Таблиця 3.4

Вплив тривалості фотоперіоду на морфогенну активність експлантів кактусів *in vitro* (1 мг/л БАП та 1 мг/л ІБК)

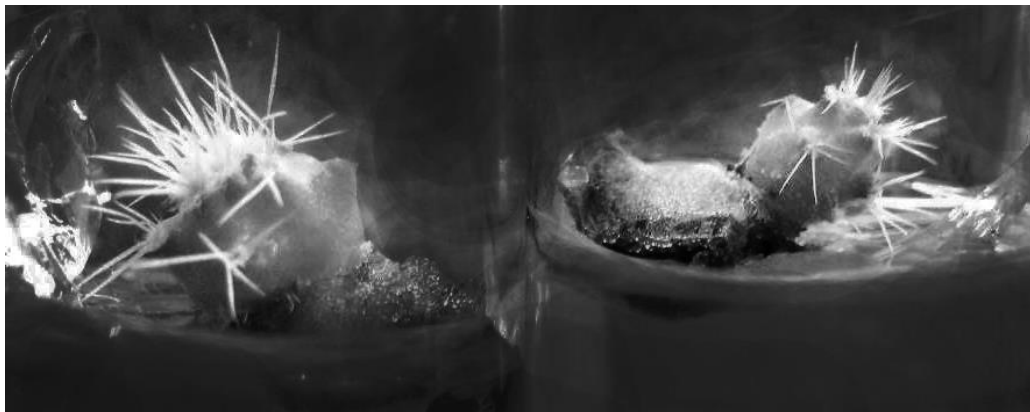
Тривалість фотоперіоду, годин	Калусогенез, %	Морфогенез, %	Загинуло експлантів, %
<i>Astrophytum myriostigma v. monstrosa</i> cv. "Lotus Land"			
24	37	52	11
12	29	62	9
8	26	64	10
НІР ₀₅	3	4	2
<i>Sclerocactus spinosior ssp. blainei</i> "Schleseri"			
24	78	20	2
12	12	87	1
8	11	85	4
НІР ₀₅	5	4	2



1



2



3

Рис. 3.6. Вплив тривалості фотоперіоду на формування експлантів у *Sclerocactus spinosior ssp. blainei "schleseri" in vitro* (1 мг/л БАП та 1 мг/л ІБК, довжина фотоперіоду 1 - 24 годин, 2 - 12 годин, 3 - 8 годин).

Освітлювальні лампи, встановлені на металевих каркасах світлових стелажів (рис. 3.7), мали характеристики, які наведені в таблиці 3.5. Порівняно із контрольними, енергозберігаючі лампи згідно з характеристиками виробників поступалися за таким показником, як відношення між затратами електроенергії і світловим потоком. На контролі на 1W затраченої потужності приходилося 68,06 lm, тоді як в дослідних ламп лише 54,0 lm, що становить на 20,6% менше.

Згідно із характеристиками виробників дослідні лампи поступалися "ЛБ 36" за показником номінальної тривалості горіння – 8 тис. годин проти 12 тис. годин. Тобто ресурс таких ламп менший на 33,3 %. "ЛБ 36" також є дешевшими, порівняно з дослідними, але дещо дорожчим є монтаж таких ламп на освітлювальний стелаж. Загалом затрати (ціни станом на 01.03.2008) на придбання ламп та супроводжуючого обладнання (пускові механізми, провід та інше) на один освітлювальний стелаж із 10 полицями становить в контролі 1284 грн., а з лампами Промінь 30 - 1485 грн.

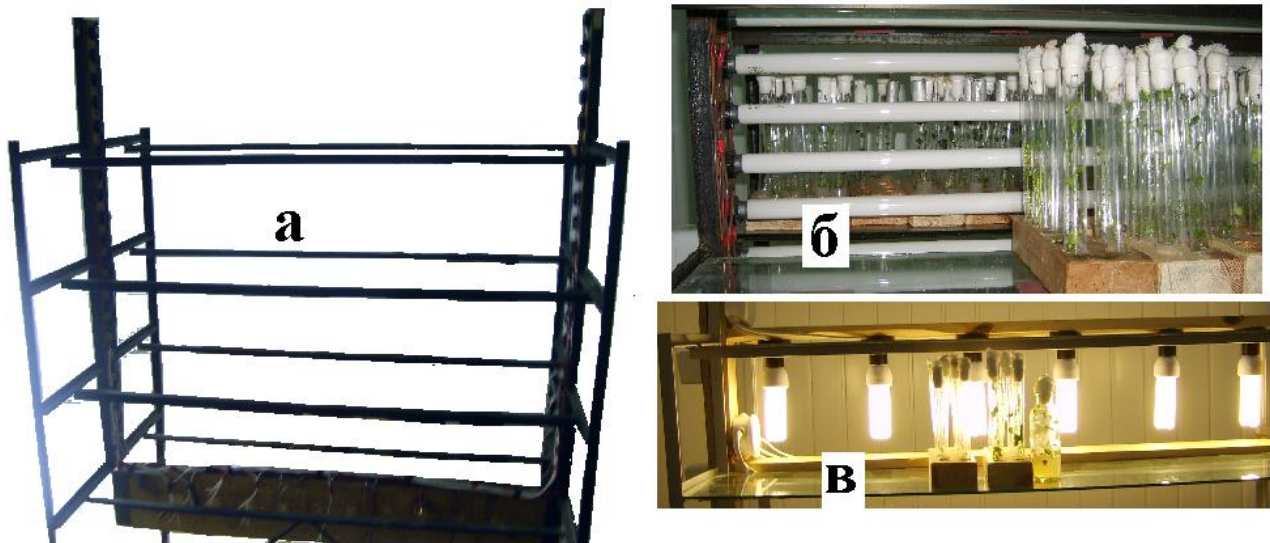


Рис. 3.7. Освітлювальний стелаж та способи комплектування його лампами:
 а) металевий каркас, б) полиця з 5 лампами ЛБ 36,
 в) полиця з 6 лампами “Промінь 30”.

Таблиця 3.5.

Технічні характеристики ламп при обладнанні світлових стелажів

Показник		“ЛБ-36” (контроль)	Енергозберігаюча лампа «Промінь 30»
Виробник, країна		ОАО «Свет», Росія	“Союз-Світло”, Україна
Кількість ламп, що розміщується на одну полицю світлового стелажа		5	6
Затрати електроенергії, W	на одну лампу	36	30
	на одну полицю	180	
Світловий потік однієї лампи, lm		2450	1620
Співвідношення між затратами електроенергії (W) і світловим потоком (lm)		68,06	54,0
Номінальна тривалість роботи, годин		12000	8000
Вартість, грн.	однієї лампи	6,75	19,60
	ламп на одну полицю	33,75	117,6
Затрати на встановлення, грн.	однієї лампи	21,40	5,15
	ламп на одну полицю	107,0	154,5
Затрати на комплектування одного освітлювального стелажа, грн.		1284 грн.	1485 грн.

Дослідженнями впливу вищезгаданих ламп на рослини-регенеранти картоплі *in vitro* встановлено таке (табл. 3.6): рослини вирощені за освітлення лампами з меншим світловим потоком (“Промінь 30”), як порівняти з контрольними (“ЛБ-36”), мали більші розміри стебла та меншу кількість листків, але з більшими листовими пластинками. При освітленні лампами “ЛБ-36”, навпаки, переважав розвиток над ростом: рослини були меншими, але з більшою кількістю міжвузлів. Ця закономірність зберігалася як при вирощуванні регенерантів *in vitro*, так і *ex vitro*.

Таблиця 3.6

Вплив світлоносіїв на розвиток регенерантів картоплі на 15 день, сорт “Подольська”

Вид освітлювальних ламп	Рослини-регенеранти <i>in vitro</i>		Рослини-регенеранти <i>ex vitro</i>	
	Висота, см	Кількість міжвузлів на стеблі, шт.	Висота, см	Кількість міжвузлів на стеблі, шт.
“ЛБ 36”	12,3	6,7	16,3	7,3
“Промінь 30”	14,4	5,2	18,8	5,6
НІР ₀₅	1,1	0,8	1,8	0,9

На нашу думку, для освітлення досліджувані типи ламп при МКР картоплі необхідно використовувати диференційовано: “ЛБ-36” – для прискорення розвитку, а лампи “Промінь 30” для отримання регенерантів із більшими розмірами (рис. 3.8).



Рис 3.8. Вплив спектру освітлення на ріст і розвиток регенерантів картоплі живців на 15 день (сорт “Подольська”):

а) рослина-регенерант, вирощена завдяки освітленню лампами “ЛБ 36”,

б) рослина-регенерант, вирощена завдяки освітленню лампами “Промінь 30”

Отже, як світлоносії лампи “ЛБ-36” та “Промінь 30” відрізняються і за технічними характеристиками, і за впливом на рослини-регенеранти.

Окрім світлоносіїв, що порівнювалися останнім часом стрімкого поширення набуває застосування різноманітних діодних світлоносіїв (рис. 3.9). Згідно з нашими



Рис. 3.9. Полиця із діодним освітленням

спостереженнями, на практиці їхні переваги такі: зменшення затрат на електроенергію; майже не нагріваються (мінімальні затрати на кондиціонування); можна щільніше ставити полиці в межах освітлювальних стелажів; легше підібрати за спектром для потреб рослин; рівномірність розподілу світлового потоку.

Із появою таких світлоносіїв постає потреба в підборі їх згідно з вимогами біологічних об'єктів до культивування (спектр, інтенсивність освітлення). Це дозволить удосконалити МКРР.

3.2. Природа детермінації онтогенезу фітогормонами

Біологічні технології передбачають технологічні процеси з використанням об'єктів природного походження як засобу і предмету виробництва. Для управління ними, крім фізичних факторів (температура, світло і т. п.), 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, що 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 [56].

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. 3.10).

Серед експлантів різних сортів одного й того ж виду рослин часто спостерігається неоднаковий прояв реакції на додавання в середовище регуляторів росту. Це певною мірою відображає ендогенне співвідношення ростових речовин, що є генетично обумовленою ознакою сорту [22].

Такі речовини впливають на диференціацію і дедиференціацію клітин та 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. У біотехнологічних дослідженнях найчастіше використовують гормони, що стимулюють ріст і розвиток рослин: цитокініни, ауксини, гібереліни [95].

Відкриття цитокінінів розпочало еру культивування рослинних клітин *in vitro*. Першим типом культивованих тканин був калюс, отриманий із серцевинної паренхіми тютюну. У природі калюси утворюються в місцях пошкодження. Якщо рослині необхідно якомога швидше закрити клітинами рану, це забезпечується завдяки заповненню її недиференційованою масою клітин. І лише пізніше відбувається диференціація і відновлюються пошкоджені судини, покривні і механічні тканини [73, 95].

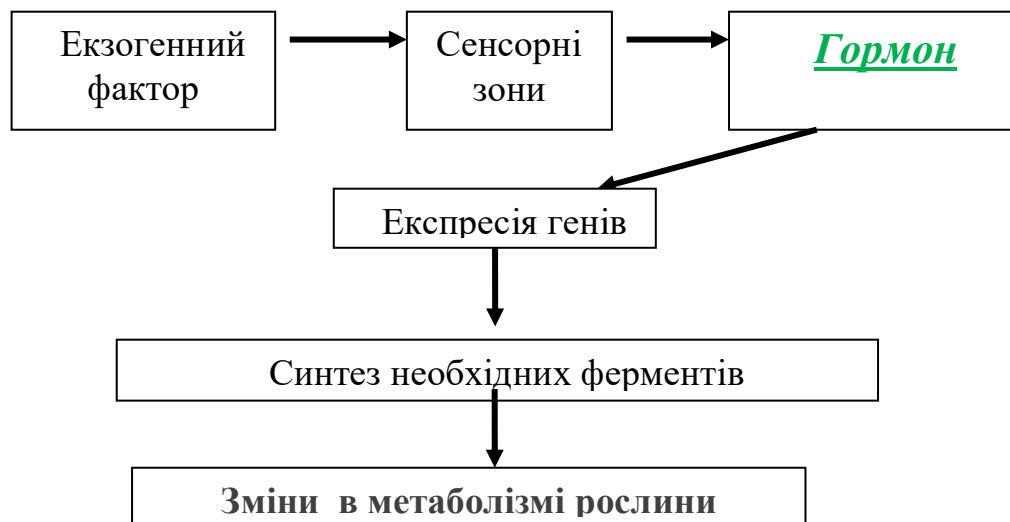


Рис. 3.8. **Зміни метаболізму рослин залежно від гормонів** (за Ф.Л. Калініним та ін., [56])

Для того, щоб рослинні об'єкти швидко розмножувалися *in vitro*, в середовище необхідно додавати ауксини і цитокініни. Зміни у співвідношенні ауксин/цитокінін (ауксинцитокініновий індекс) спричиняють суттєві відмінності 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 [95, 107]: у разі переважання ауксинів (нестачі цитокінінів) розпочинається процес *ризогенезу* (від грецького *rhizo* – корінь; *genesis* – народження). Якщо ж переважають цитокініни (нестача ауксинів), утворюються меристеми пагонів: розпочинається *геммагенез* (*gemma* – брунька рослини).

Така організація клітин добре узгоджується з функцією ауксинів і цитокинінів як “гормонів добробуту” пагонів та коріння 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 при нестачі цитокинінів (утворюються корені).

У разі видалення із середовища ауксинів і цитокинінів, у культурі клітин часто розпочинається утворення біполярних сполук – зародків. У кожного з них буде своє джерело цитокинінів (кореневий полюс) і своє джерело ауксинів (пагоновий полюс). Такі структури, схожі на зародок насінини, називають ембріодами (*embryo* – зародок; *eidos* – схожий) [19].

Цитокиніни – це похідні пурину (аденіну), які стимулюють поділ клітин та їх диференціювання, а також затримують процеси старіння. Найбільш відомі цитокиніни: кінетин (6-фурфуриламінопурин) [107], зеатин [78], 6-БАП (6-бензиламінопурин) [95].

Цитокиніни виявлено в різних тканинах рослин, але особливо багаті ними кінчики коренів, ксилемний сік, насіння, що проростає, пухлини корончатих галів [56, 114]. Так 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 є причиною збільшення кількості полірибосом та активації синтезу білків. Кінцева дія цитокинінів зумовлює зміну експресії генів на транскрипційному рівні. Цитокиніни, як і ауксини, активно застосовуються в експериментах із культурою тканин. Вони мають важливе значення для різних біотехнологічних процесів [73, 78, 95].

Серед цитокинів першим був описаний кінетин, виділений в лабораторії Ф. Скуга із старих зразків ДНК оселедця, а також інших зразків ДНК, що автоклаувалися 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 [72, 73].

Загально визнаним є механізм реакції окислення цитокинів [143]. Він полягає в тому, що цитокиніноксидаза окислює зв'язок між N⁶ залишку аміногрупи і C₁ ізопреноїдного ланцюга, в результаті чого утворюється імінопурин, який зі свого боку гідролізується, утворюючи альдегід і аденін [211].

Існує дослідження про те, що додавання екзогенних цитокинінів у деяких системах викликає значне, відносно швидке, але тимчасове підвищення активності цитокиніноксидази. Час виявлення, ступінь і тривалість стимуляції ферментативної активності залежить від типу і концентрації гормону, а також типу рослинної тканини [115].

Оскільки природні цитокиніни є надзвичайно дорогими, тому триває пошук синтетичних. Закордонні зразки цитокинінів є надзвичайно дорогими, і в нашій країні їх постачають декілька організацій і тільки під замовлення, термін якого може коливатись межах 3 -5 і більше місяців. Ці чинники і зумовлюють пошук дешевих вітчизняних аналогів. Серед них вагоме місце займають речовини, синтезовані доцентом НДЦ «АСКО» Інституту біоорганічної хімії і нафтохімії НАНУ П. Г. Дульневим [20, 162]. Ми продовжили розпочаті раніше дослідження з МКРР [91] із випробування дослідного зразка фізіологічно-активних речовини з цитокиніновою активністю Д-9.

Ауксини. Найбільш поширений представник індоліл-3-оцтова кислота ($C_{10}H_9NO_2$) - біла кристалічна речовина з молекулярною масою 175,19 і температурою плавлення $168^{\circ}C$. На світлі швидко темніє. Максимум поглинання знаходиться в області 279 нм. ІОК добре розчинна в метиловому, етиловому і в інших спиртах, в сірчаному ефірі й етилацетаті. Погано розчиняється у холодній 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.

ІОК – головний природний ауксин, який швидко розщеплюється ферментом індолацетатоксидазою. Активність цього ферменту гальмують деякі ортодифеноли. Стимулююча дія ортодифенолів на ріст була відома досить давно. Спочатку вважали, що ці речовини і є ауксини. Насправді ж їхня стимулююча дія пояснюється тим, що вони пригнічують активність індолацетатоксидази, а це спричиняє підвищення вмісту в тканинах рослини ендогенної ІОК [174].

Ауксини відкриті завдяки дослідженням росту розтягуванням і явища тропізмів у рослин. Проте, їхні функції набагато ширші і, у дійсності, охоплюють всі сторони життєдіяльності рослинного організму. Так, то ауксин є обов'язковим учасником координації процесів морфогенезу, рухової і функціональної активності у рослин. Присутність ауксину (разом з цитокініном) абсолютно обов'язкова для індукції поділу клітин. Ауксин необхідний, насамперед, для ініціації реплікації ДНК. Перехід клітин до мітозу і цитокінезу залежить, як правило, від присутності цитокініну, проте високі концентрації ауксину здатні і без цитокініну викликати мітоз у соматичних клітинах рослин [122, 174].

Численні дані [19, 73, 79, 82, 122, 174] свідчать про вплив ІОК і її синтетичних аналогів на мітотичну активність тканин у цілих рослинах. Відомо, що ІОК, особливо навесні, в апікальних меристемах у період їх високої активності зумовлює функціональну діяльність камбію. Під впливом ауксину починається розростання тканин зав'язі, причому на початку ІОК виділяється пилком, а потім насінням, яке розвивається і стає продуцентами ІОК та інших фітогормонів. Надходження ІОК в тканини плоду – обов'язкова умова його формування. Із появою ауксинів плід стає активним атрагуючим центром. Прикладом дії ІОК на поділ клітин є індукція утворення коренів. Проте, занурення проростків корінням у розчин із високою концентрацією ауксину спричиняє гальмування їхнього росту [174].

На процеси ризогенезу впливає ендогенне співвідношення ауксинів і цитокінів. Специфічність рослин у відношенні реакції на ауксини різної хімічної будови визначається відмінностями поглинання й метаболізації цих сполук. Також різною може бути будова в рослині ауксинового акцептора [16, 204].

Із нашого практичного досвіду встановлено різну реакцію рослин на синтетичні гормони. Так, наприклад при масовому розмноженні лохини сортів “Блюкроп”, “Патріот” встановлено відсутність цитокінінового (регенеранти росли так само як на контролі без цитокінінів) ефекту при додаванні 1-15 мг/л бензіламінопурина або 5-80 мг/л аденіну. Лише додавання 1-4 мг/л 2-іР (N6-(2-ізопентіл) аденін) дозволило отримати зняття апікального домінування та інші ефекти, які винакають при додаванні цитокінінів.

Також встановлено відсутність ауксинового ефекту за умови культивування хости на середовищі з ІОК. Для цього виду рослин ефективною виявилася ІМК. Водночас, ІМК була майже не ефективною при МКР кизилу. Ризогенез був відсутнім. Натомість відбувалося інтенсивне калюсоутворення в базальній частині пагона (рис. 3.11). Ризогенез вдалося індукувати лише за умови використання 0,7-1,2 мг/л нафтилоцтової кислоти.



Рис. 3.11. Інтенсивне калусоутворення в базальній частині пагона кизилу при використанні ІМК як ауксину.

Отже, дослідження, які ведуться з фітогормонами для практичного їхнього практичного використання з покращення регенераційного процесу технологій МКРР, є досить перспективними. Як регулятори росту рослин також можна використовувати синтетичні аналоги і застосовувати ці фітоактивні сполуки в різноманітних галузях біотехнології, фізіології рослин та насінництва.

3.3. Реакція регенерантів картоплі на гормони

МКР картоплі передбачає застосування в багатьох середовищах гормону з класу цитокинінів – кінетину. Однак відомо, що значно дешевший аденін є вихідною сполукою для синтезу його в рослині і має слабку цитокинінову активність [73]. Нами встановлено, що під час отримання мікробульб ефект від додавання в середовище аденіну в кількості лише 1 мг/л без кінетину, як порівняти з контролем, незначний – на межі істотної різниці (табл. 3.7). Застосування аденіну в кількості 1 мг/л сумісно з кінетином, порівняно з контролем, збільшувало вихід мікробульб з 75 до 103 %. У окремих пробірках зав'язувалися по дві мікробульби.

Додавання у живильне середовище під час отримання мікробульб аденіну в кількості 20,0 та 25,0 мг/л рівноцінне дії 1,0 мг/л кінетину. Під час сумісного застосування аденіну і кінетину у згаданих концентраціях відмічено їхній фітотоксичний вплив (вітрифікація, калусоутворення).

Оскільки природні цитокиніни є надзвичайно дорогими, тому постійно ведеться пошук синтетичних [13, 20, 162]. Зокрема, нами випробувано вітчизняний препарат Д-9. Відмінність його, порівнюючи з аденіном та кінетином, проявилася ще під час приготування середовища.

Таблиця 3.7

Вплив концентрації аденіну на бульбоутворення *in vitro* рослин картоплі, сорт “Подолька”

Варіант	Висота рослин, мм	Кількість вітріфікованих рослин, %	Вихід мікробульб, %
Без кінетину та аденіну (контроль)	188	1,4	75
Аденін 1мг/л	173	2,2	81
Кінетин 1мг/л	164	2,9	96
Аденін 1мг/л + кінетин 1мг/л	176	2,7	103
Аденін 20 мг/л	175	1,1	165
Аденін 25 мг/л	156	3,4	162
Аденін 20 мг/л + кінетин 1мг/л	58	25,7	64
Аденін 20 мг/л + кінетин 1мг/л (культивування в темноті)	-	2,7	171
Аденін 25мг/л + кінетин 1мг/л	46	28,3	35
Аденін 25мг/л + кінетин 1мг/л (культивування в темноті)	-	4,4	156
НІР ₀₅	8	2,7	6

Досліджуваний аналог природних цитокінінів – Д-9 виявився ефективним для процесів, столоно- та бульбоутворення в концентраціях 0,01 мг/л, проте високі концентрації його зумовлювали фітотоксичність (рис. 3.12).

Це пов'язано із тим, що постійна присутність у складі середовищ підвищених концентрацій цитокінінів викликає утворення вітріфікованих пагонів. За таких умов порушується технологічний цикл отримання рослин-регенерантів і втрачається рослинний матеріал *in vitro*.

Перший розчинявся у звичайній воді, тоді як аденін і кінетин розчиняються в спирті, а згодом часом випадають в осад. Для повторного розчинення осаду необхідний тривалий час розмішування у водяній бані за невисокої температури, що ускладнює процес приготування середовищ.



Рис. 3.12. Фітотоксичний прояв високої концентрації Д-9 (5 мг/л) в штучному живильному середовищі, сорт “Подолька”
1 – вітріфікація; 2 – калюсоутворення.

Під час застосування препарату Д-9 у рослин відмічалось інтенсивне столоноутворення, при зменшенні кількості листків (рис. 3.13). На одній рослині *in vitro* кількість столонів була від 7 до 10 шт., а в окремих – до 18-20 шт.

Отримані дані зс столоноутворення за умови впливу Д-9 підтверджувалися в умовах *ex vitro* під час обробки живців шляхом обприскування в закритому ґрунті (касетах). Обприскування регенерантів 0,001% розчином (0,01 мл/л) Д-9, у порівнянні з контролем, стимулювало інтенсивне столоноутворення, але пригнічувало ризогенез (рис. 3.14).

При порівнянні ефективності кінетину, аденіну, і Д-9 у процесі отримання мікробульб встановлено, що ці фізіологічно активні речовини зумовлюють неоднакову кількість бульб у рослинах. Посилене бульбоутворення детермінувалося сумісним застосуванням вказаних речовин з культивуванням регенерантів без світла (табл. 3.8).



Рис. 3.13. Вплив Д-9 на столоноутворення в регенерантів з живців картоплі *in vitro*.



Рис. 3.14. Детермінуючий вплив препарату Д-9 на онтогенез регенерантів картоплі з живців *ex vitro* в умовах закритого ґрунту

Таблиця 3.8

Вплив речовин з цитокініноюю активністю та освітлення на бульбоутворення *in vitro* (%), сорт “Подільянка”

Варіант освітлення	Без гормонів (контроль)	Кінетин (еталон)	Аденін	Д-9
Світло	93,2	102,2	106,3	109,3
Без світла	113,6	134,3	132,0	189,4
НІР ₀₅	11,9	9,7	8,6	14,2

Отже, під час бульбоутворення *in vitro* 1 мг/л кінетину можна замінити додаванням у середовище 20-25 мг/л аденіну або препарату Д-9 – 0,01 мл/л.

3.4. Детермінація онтогенезу рослин картоплі в умовах *in vitro* новими синтетичними фітогормонами

Під час МКР безвірусного вихідного насінневого матеріалу картоплі онтогенез регенерантів детермінують найчастіше в один з двох напрямів: бульбоутворення *in vitro* або інтенсивний ризогенез. За умови першого з них у регенерації рослин і утворення ними мікробульб інтенсивний розвиток пагона і кореневої системи не є основним завданням. Важливо, щоб рослина формувала столони та бульби. Наприклад, під час отримання мікробульб методом “культури одного вузла” [96] регенеранти взагалі не формували пагони, а відразу з пазухи листка утворювали стolon(и) і бульбу(и).

У процесі реалізації другого напрямку формуються регенеранти з інтенсивно розвиненим пагоном і за можливістю більшою кореневою системою. Такі рослини використовують для висадки в закритий, а при зрошенні – і у відкритий ґрунт [96]. Фітогормони є однією з основних детермінант спрямування онтогенезу регенерантів із живців згідно потребами технологічного процесу [20].

Через високу вартість природних гормонів у нашій роботі випробувано дві синтетичні речовини з фітогормональною активністю синтезовані в НДЦ «АСКО» Інституту біонеорганічної хімії і нафтохімії НАНУ: Д-9 (за інформацією автора П. Г. Дульнєва препарату властива цитокінінова активність) та Д-18 (характеризується ауксиноюю активністю).

Метою дослідження було детермінування впливу на онтогенез регенерантів нових синтетичних фітогормонів при МКР картоплі. Культивування регенерантів проводили в міжкафедральній лабораторії Білоцерківського НАУ “Біотехнологія рослин”. Регенеранти культивували *in vitro* в пробірках на штучному живильному середовищі за прописом Мурасіге і Скуга в модифікації Інституту картоплярства НААНУ з додаванням сахарози (30 і 60 г/л) за загальноприйнятою методикою [66]. Обсяг вибірки – 30 рослин. Для визначення ефективності новостворених речовин їх порівнювали як з безгормональним контролем (без цитокінів у випадку із Д-9 та без ауксинів у випадку із Д-18), так і з еталонними синтетичними фітогормонами. Тобто, Д-9 порівнювали з кінетином (1 мг/л, “Merck”, Німечина), а Д-18 з ІОК (1 мг/л, “Sigma” США).

Під час регенерації рослин картоплі *in vitro* з живців на середовищах збагачених сахарозою (60 г/л), що містили Д-9 (0,01 мл/л) або кінетин (1 мг/л) встановили такі відмінності: кінетин, у порівнянні з контролем без цитокинів, знижував біометричні показники ризогегезу у регенерантів. Зменшувалася як довжина кореневої системи (максимальна довжина кореня), так і кількість коренів. Отримані результати узгоджувалися з правилом Скуга-Міллера: при переважанні цитокинінів над ауксинами пригнічується ризогенез та апікальне домінування, а стимулюється ділення клітин, що проявлялося в утворенні бруньок та пагонів. Завдяки додаванню Д-9 (0,01 мг/л) у рослин посилювалося столоноутворення (найкращий результат в досліді), і одночасно поліпшувалося коренеутворення. Так, у сорту “Повінь” довжина кореневої системи становила 139,8 мм проти 103,7 мм у контролі, а в сорту “Слов’янка” відповідно, 179,5 мм і 145,7 мм, тоді як регенеранти, вирощені на середовищі з кінетином, мали коротшу кореневу систему (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Вплив кінетину і Д-9 на регенерацію рослин картоплі *in vitro* (на 30 день культивування).

Фітогормон, концентрація	Висота пагона, мм	Кількість міжвузлів, шт.	Стан листків	Довжина кореневої системи, мм	Рослин із столонами столонів, %	Вихід мікробульб із регенерантів, %
Сорт “Повінь”						
Без гормону	156,5	7,7	Дрібні, світло-зелені	103,7	1,4	93,2
Кінетин, 1 мг/л	176,7	8,6	середніх розмірів, темно зелені	97,9	2,4	98,4
Д-9, 0,01 мл/л	159,8	6,5	великі, темно-зелені	139,8	9,3	102,4
НІР ₀₅	9,7	0,3		11,4	0,7	5,6
Сорт “Слов’янка”						
Без гормону	167,3	6,5	дрібні, світло-зелені	145,7	1,8	129,1
Кінетин, 1 мг/л	173,3	7,1	середніх розмірів, темно зелені	106,1	2,2	176,4
Д-9 0,01 мл/л	189,4	6,3	великі, темно-зелені	179,5	10,0	188,5
НІР ₀₅	8,3	0,4		12,4	1,4	7,7

Ймовірним поясненням покращення ризогенезу може бути відсутність впливу Д-9 на активацію ферментів (аукинооксидази), які розкладають аукини перексидазним шляхом, або ж ця речовина виконує функцію протектора, що затримує окислення аукинів. У природі прикладом такої ситуації є молоді тканини, що інтенсивно ростуть і яким характерна значна кількість протекторів і низька активність оксидази ІОК [73, 174].

Під час застосування Д-9 (0,01 мл/л) у обох сортів було відзначено інтенсивне столоноутворення. Так, у сорту “Повінь” було в середньому 9,3 столони на рослину, порівняно з 1,4 столони без гормонів, та 2,4 столони на рослину у випадку додавання в середовище кінетину.

Застосовування Д-9 для отримання мікробульб дозволило зробити висновок, що ця фізіологічно активна речовина стимулює збільшення кількості бульб в рослинах. За цим показником варіант з препаратом Д-9 перевищував контроль і еталон (кінетин). Так, у сорту “Повінь” застосування препарату Д-9, порівняно з контролем, збільшувало вихід мікробульб у регенерантів з 93,2 до 102,4 %, а в сорту “Слов’янка” із 129,1 до 188,5.

Наступним етапом наших досліджень було випробування речовини з аукиновою активністю – Д-18 (табл. 3.10). У регенерантів картоплі сортів “Повінь”, “Слов’янка” встановлено кращий розвиток пагона та кореневої системи у варіанті із додаванням в штучне живильне середовище Д-18 у кількості 0,01 мл/л.

Таблиця 3.10

Вплив ІОК та Д-18 на розвиток пагона картоплі в асептичних умовах

Варіант	Висота пагона, мм	Кількість міжвузь, шт.	Стан листків	Довжина кореневої системи, мм	Кількість коренів, шт.
Сорт “Повінь”					
Контроль (без гормонів)	156,5	7,7	дрібні, світло-зелені	43,7	8,7
ІОК, 1 мг/л	125,0	5,9	великі, темно-зелені	104,1	12,6
Д-18; 0,01 мл/л	138,5	6,3	великі, темно-зелені	139,4	16,4
НІР ₀₅	7,2	1,3		7,8	2,1
Сорт “Слов’янка”					
Контроль (без гормонів)	167,3	6,5	дрібні, світло-зелені	62,2	9,3
ІОК, 1 мг/л	137,3	5,1	великі, темно-зелені	127,3	16,2
Д-18; 0,01 мл/л	142,1	5,7	великі, темно-зелені	157,8	18,7
НІР ₀₅	5,6	1,3		8,4	2,3

Використання препарату Д-18 за ефективністю ризогенезу переважало як контроль, так і еталон – ІОК. Зокрема, в сорту “Повінь” Д-18, як порівняти з контролем, спричинив збільшення довжини кореневої системи з 43,7 до 139,4 мм. Відмічено також приріст кореневої системи і в сорту “Слов’янка”. Аналогічне стосувалося кількості коренів у регенерантів.

Нами також порівняно ефективність сумісного застосування цитокинінів та ауксинів як рекомендованих у прописах середовищ, так і новосинтезованих у двох типах середовищ: звичайне для живцювання (3% сахарози) та збагачене сахарозою (6%) для отримання мікробульб. Це пов'язано з тим, що середовища із 3% вмістом сахарози застосовують для живцювання *in vitro* і перед висадкою регенерантів в постасептичні умови. Таким рослинам для початку росту, перш за все, необхідно мати потужну кореневу систему, а також добре розвинений фотосинтетичний апарат (листки) для якомога швидшої адаптації рослин до автотрофного живлення.

Додавання в штучне живильне середовище гормонів як класичних (кінетин, ІОК), так і новосинтезованих (Д-9, Д-18) одночасно двох класів збільшувало біометричні параметри листків і коріння (табл. 3.11). Позитивний ефект взаємодії Д-9 та Д-18 (синергізм) зумовлював у сорту “Повінь” збільшення висоти пагона з 156,5 мм на безгормогальному контролі до 176,2 мм, у варіанті із застосуванням ІОК та кінетину висота пагона становила 174,7 мм. Відповідне відзначено і в сорту “Слов’янка”. Різниця за висотою пагона між сумісним застосуванням класичних (ІОК+кінетин) і досліджуваних гормонів (Д-9+Д-18) була в межах найменшої істотної різниці (НІР₀₅).

Синергічний вплив обох речовин на регенеранти сортів також виявлено за кількістю коренів та їхньою довжиною.

Під час регенерації рослин картоплі з живців *in vitro* на середовищах, збагачених сахарозою (6%), що містили Д-9 (0,01 мл/л) і Д-18 (0,01 мл/л) встановили відмінності в формуванні пагонів, кореневої системи, столонів та бульб (табл. 3.12). Сумісне застосування препаратів, порівнюючи з контролем та еталонами, збільшувало висоту регенерантів, довжину кореневої системи та кількість мікробульб у регенерантів.

Таблиця 3.11

Ефективність застосування БАР при культивуванні регенерантів на середовищах із 3% вмістом сахарози на 30 день культивування

Варіант	Висота пагона, мм	Кількість міжвузль, шт.	Довжина кореневої системи, мм	Кількість коренів, шт.
сорт “Повінь”				
1. Контроль (без гормонів)	156,5	7,7	43,7	8,7
2. ІОК (1 мг/л) + кінетин (1 мг/л)	174,7	8,3	123,9	9,6
3. Д-9 – 0,01 (мл/л)	159,8	6,5	139,8	3,7
4. Д-18 – 0,01 (мл/л)	138,5	6,3	139,4	16,4
5. Д-9 – 0,01 (мл/л) + Д-18 (0,01 мл/л)	176,2	8,8	147,7	13,7
НІР ₀₅	6,9	0,2	7,8	0,3
Сорт “Слов’янка”				
1. Контроль (без гормонів)	167,3	6,5	62,2	9,3
2. ІОК (1 мг/л) + кінетин (1 мг/л)	174,2	7,1	80,4	11,4
3. Д-9 – 0,01 (мл/л)	189,4	6,3	179,3	4,1
4. Д-18 – 0,01 (мл/л)	142,1	5,7	157,8	18,7
5. Д-9 – 0,01 (мл/л) + Д-18 (0,01 мл/л)	183,4	7,4	163,7	15,2
НІР ₀₅	8,9	0,3	7,4	0,3

Таблиця 3.12

Детермінація росту і розвитку регенератів новими синтетичними гормонами, з 6 % вмістом сахарози на 30 день культивування

Варіант	Довжина пагона, мм	Довжина кореневої системи, мм	Кількість, шт.			
			міжвузлів	коренів	столонів	мікро бульб
Сорт "Повінь"						
контроль	134	38	8,1	9,1	1,4	93,2
кінетин+ІОК	141	43	6,8	10,4	2,9	129,3
Д-9	147	46	5,6	4,0	9,3	105,8
Д-18	145	78	7,9	21,9	2,3	101,4
Д-9+ Д-18	163	88	8,4	18,7	8,4	186,7
НІР ₀₅	7,4	2,3	0,3	0,4	0,2	9,1
Сорт "Слов'янка"						
контроль	153	43	8,3	11,4	1,8	98,6
кінетин+ІОК	157	56	7,2	15,9	3,2	148,1
Д-9	162	47	6,7	5,7	10,0	118,2
Д-18	158	64	8,6	23,4	2,7	107,6
Д-9+ Д-18	169	74	8,4	20,7	9,6	213,7
НІР ₀₅	8,2	3,1	0,4	0,5	0,2	11,3

Щодо останнього, встановлено наступну залежність: ауксини (в нашому дослідженні це ІОК, Д-18) збільшували розміри мікробульб, але кількість зав'язування їх на регенерант становила одна, дві, рідше три. Це пов'язано з ініціацією у рослині небагатьох атрагуючих центрів (ділянок, які притягують, споживають пластичні речовини). Ними є верхівки надземного пагона та 1-2 бульби, які встановлюють із допомогою ауксинів апікальне домінування.

Цитокініни (кінетин, Д-9) знімають апікальне домінування, а отже, збільшують кількість атрагуючих центрів (столонів), що проявляється в пробудженні пазушних бруньок як на стеблі, так і на столоні, а також в утворенні нових столонів. Наслідком згаданої дії цитокінів є утворення більшої кількості мікробульб, хоча й дещо менших, ніж за наявності 1-2 апікальних атрагуючих центрів. Проте, збільшення кількості мікробульб не завжди забезпечується необхідними пластичними речовинами. Ці результати дослідження та зроблені на їхній основі узагальнення співпадають з отриманими раніше результатами інших авторів [41, 158, 162].

Збільшення кількості атрагуючих центрів вплинуло як на кількість мікробульб, так і на їхні розміри (рис. 3.15). Порівнюючи ефективність бульбоутворення залежно від поєднань двох гормонів (класичних або нових), ми враховували вихід кондиційних мікробульб, які можна використовувати в закритому ґрунті. Такого розміру, за дослідженнями В.С. Різника, є мікробульби діаметром не менше 4 міліметрів [135].

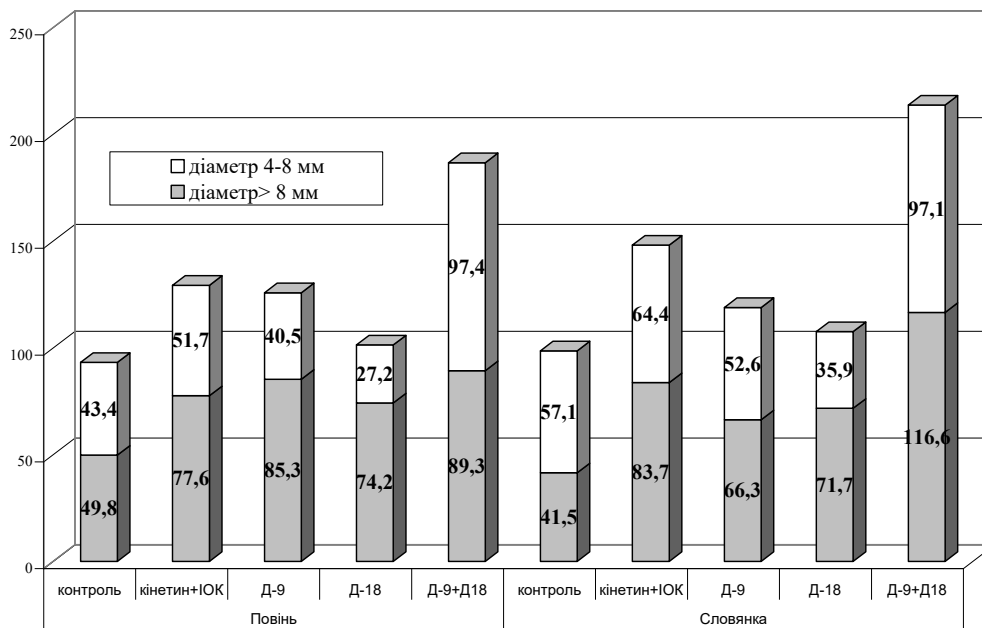


Рис. 3.15. Вплив гормонів на вихід мікробульб за фракціями у регенерантів, %

Порівнюючи з контролем, кінетин сумісно із ауксином збільшували вихід мікробульб з 93,2 до 129,3 % у сорту “Повінь” і з 98,6 до 148,1 % у сорту “Слов’янка”. Застосування новосинтезованих речовин збільшувало кількість мікробульб у сорту “Повінь” до 186,7%, а в сорту “Слов’янка” – до 213,7 %.

Застосування препарату Д-18 як окремо, так і сумісно з Д-9 збільшувало частку великих мікробульб ($\varnothing > 8$ мм). Використання лише Д-18, як порівняти з Д-9, забезпечувало меншу кількість мікробульб, проте його застосування збільшувало кількість мікробульб із діаметром, який перевищував 8 мм.

Загалом і класичні і новосинтезовані гормони покращують процеси бульбоутворення. Препарати Д-9, Д-18 є більш ефективними, ніж кінетин й ІОК відповідно. Тому вважаємо, що після занесення до “Переліку пестицидів та агрохімікатів, дозволених до використання в Україні”, Д-9 та Д-18 доцільно застосовувати для отримання мікробульб картоплі *in vitro* в кількості 0,01 мг/л,

3.5. Вплив світла, термоіндукції рослин-донорів на фітогормональну детермінацію

Для потреб первинного насінництва, зокрема картоплі, широко застосовується МКР безвірусного вихідного насінневого матеріалу, під час якого онтогенез регенерантів детермінують найчастіше в один із двох напрямів:

1. Регенерація рослин з утворенням ними мікробульб. Відбувається переорієнтація активності атрагуючих центрів на користь стolonів та бульб, наприклад, темнові мікробульби, отримані методом “одного вузла” [158].

2. Вирощування розсади. Формування регенерантів з інтенсивно розвинутим пагоном і кореневою системою.

Спрямувати онтогенез регенерантів з живців згідно потреб технологічного процесу, можна впливаючи цілою низкою факторів: освітленням, концентрацією вуглеводів у штучному живильному середовищі, онтогенетичним віком експланта та фітогормонами [96, 158].

Досить часто ефективність застосування гормонів лежить у вузькому інтервалі концентрації між відсутністю дії та фітотоксичністю [6, 98, 104, 105]. Тому актуальним є пошук нових синтетичних аналогів цих речовин та шляхи індукції їх у вихідних материнських рослин для синтезу регенерантами ендогенних гормонів.

За результатами дослідження з регенерації живців *in vitro* рослин картоплі на середовищах, що містили Д-9 (0,01 мл/л) і Д-18 (0,02 мл/л), виявлено відмінності у формуванні пагонів, кореневої системи, стolonів та бульб (рис. 3.16).



Рис. 3.16. Детермінація онтогенезу рослин картоплі *in vitro* новими синтетичними фітогормонами (сорт “Повінь”, 30-й день культивування).

Додавання до живильного середовища препарату Д-9 сприяло істотному збільшенню кількості стolonів із 0,7 шт. у контролі до 8,8 шт. у сорту “Повінь” та з 0,5 шт. до 9,3 шт. у сорту “Слов’янка”, відповідно. Однак, поряд з цим спостерігалось істотне зменшення кількості коренів: у 2,3 рази в сорту “Повінь” та в 2 рази в сорту “Слов’янка”. Довжина кореневої системи зменшилася у 3,2 рази та 2,5 рази, відповідно, а середній діаметр листкової пластинки у 1,5 рази та 1,4 рази.

Застосування препарату Д-18 супроводжувалося істотним збільшенням у обох сортах кількості коренів, довжини кореневої системи та середнього діаметру листкової пластинки. Так, у сорту “Повінь” кількість коренів у варіанті застосування цього фітогормону збільшувалася до 21,9 шт., порівнюючи з 9,1 шт. у контролі, довжина кореневої системи – на 40 мм (НІР₀₅ 2,3 мм), середній діаметр листкової пластинки – на 4,3 мм (НІР₀₅ 0,4 мм). У сорту “Слов’янка” відзначено аналогічне.

У досліді з вивчення сумісного впливу освітлення та речовин з цитокиніною активністю на бульбоутворення (табл. 3.13) встановлено, що застосування препарату Д-9 сприяло істотному збільшенню кількості бульб в рослинах обох сортів. Так, у сорту “Слов’янка” на світлі застосування препарату Д-9 зумовило перевищення кількості мікробульб – на 38,1 шт., як порівняти з 98,6 шт. у контролі, та на 31,3 шт., порівнюючи з варіантом застосування кінетину, відомого як стимулятор формування мікробульб [41]. У сорту “Повінь” на світлі виявлено збільшення виходу мікробульб від застосування препарату Д-9 16,1 шт. (НІР₀₅ по фактору гормон 11,9), але як порівняти із застосуванням кінетину, збільшення кількості бульб виявилось неістотним.

Таблиця 3.13

Вплив речовин із цитокиніною активністю та освітлення на бульбоутворення рослин картоплі *in vitro*, % (кількість бульб на 100 регенерантів)

Варіант освітлення	Контроль (без гормонів)	Кінетин (еталон)	Д-9
Сорт “Повінь”			
На світлі	93,2	102,2	109,3
Без світла	113,6	134,3	189,4
НІР ₀₅ за фактором гормон 11,9 НІР ₀₅ за фактором освітлення 8,7			
Сорт “Слов’янка”			
На світлі	98,6	105,4	136,7
Без світла	128,1	149,3	208,3
НІР ₀₅ за фактором гормон 11,9 НІР ₀₅ за фактором освітлення 8,7			

Максимальне бульбоутворення в обох сортів було виявлене при застосуванні препарату Д-9 на фоні культивування регенерантів без освітлення. Так, у сорту “Повінь”, порівняно з відповідним значенням показника в контролі, вихід мікробульб зростав у 1,7 разу, а в сорту “Слов’янка” – у 1,6.

Створити умови, за яких регенеранти синтезували необхідні ендогенні фактори детермінації бульбоутворення, можна і підготовкою (індукцією) вихідних рослин для живцювання [81, 141]. Нами проведено індукування бульбоутворення таким чином: рослини, які виростили на середовищі з додаванням Д-9 (0,01 мл/л), використали для живцювання на безгормональних середовищах. Тобто гормони застосовували не в процесі отримання регенерантів з живців, а індукуванням вихідних для живцювання рослин донорів експлантів. За контроль слугували вихідні рослини, які були вирощені на середовищі без додавання гормонів.

Живці з індукованих вихідних рослин сортів “Повінь” та “Слов’янка” утворювали відповідно 34,5 та 47,6 столонів на 100 регенерантів за відсутності гормонів та низького вмісту сахарози (3 %), а в контролі 4,1 та 6,3 (табл. 3.14, рис. 3.17). Це перевищення виявилось істотним у обох сортів. Регенеранти з живців, ізольованих з індукованих рослин, за кількістю бульб також істотно перевищували значення показника регенерантів, вирощених на середовищі з кінетином.

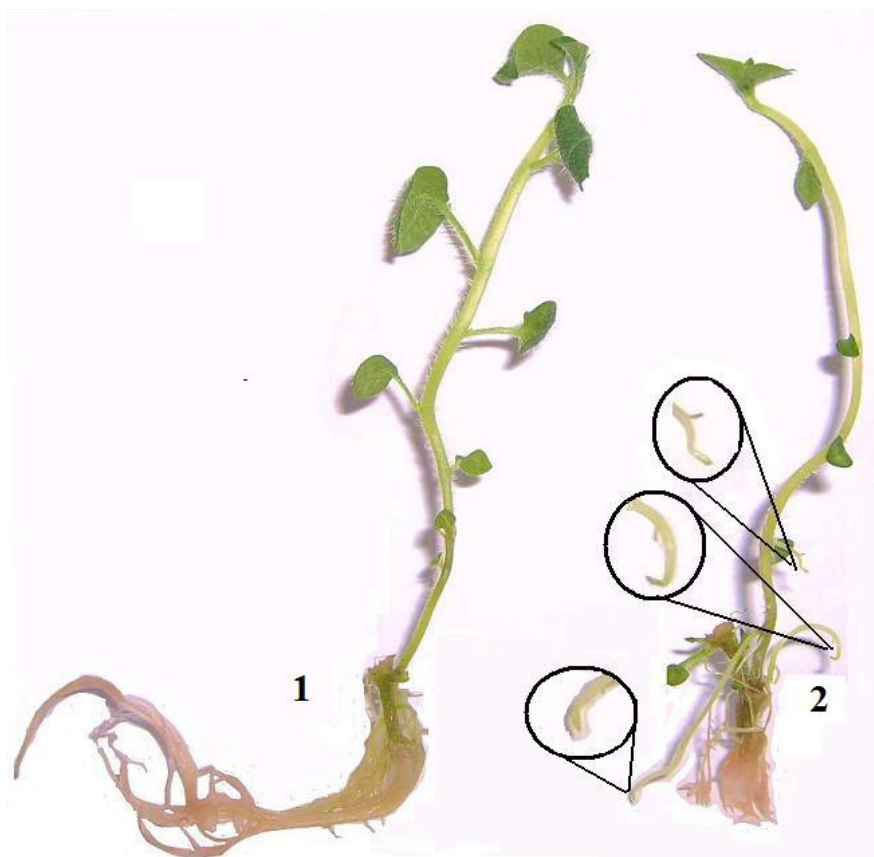


Рис. 3.17. Вплив індукції вихідних рослин Д-9 на столоноутворення у регенерантів сорту “Повінь”: 1- регенерант без індукції (контроль); 2 - індукція столоноутворення (препарат Д-9).

Таблиця 3.14

Столоно- та бульбоутворення (%) в регенерантів картоплі залежно від концентрації сахарози та культивуванням вихідних рослин на середовищах з кінетином

Умови культивування вихідних рослин	Концентрація сахарози в живильному середовищі			
	3 %		6 %	
	столонів	бульб	столонів	бульб
Сорт “Повінь”				
Контроль (без гормонів)	4,1	2,7	98,3	93,2
Кінетин (1 мг/л)	12,0	8,2	107,1	96,7
Індукування вихідних для живцювання рослин	34,5	22,1	161,2	105,8
НІР ₀₅	0,3	0,4	8,2	4,7
Сорт “Слов’янка”				
Контроль (без гормонів)	6,3	5,3	104,7	98,6
Кінетин (1 мг/л)	17,3	9,6	105,2	102,6
Індукування вихідних для живцювання рослин	47,6	32,1	173,4	118,9
НІР ₀₅	0,5	0,3	7,3	5,1

За результатами нашого дослідження детермінуючий вплив індукування Д-9 коригувався концентрацією сахарози. Так, на середовищах із 3% сахарози більшість стolonів у регенерантів перетворювалася на звичайні пагони, а на середовищах із 6% сахарози з стolonів переважно утворювалися мікробульби в обох сортів.

Культивування живців з індукованих вихідних рослин сортів “Повінь” та “Слов’янка” із 6 % сахарозою, порівнюючи з 3% сахарозою, збільшувало кількість стolonів з 34,5 та 47,6 до 161,2 та 173,4% відповідно. Також істотним було збільшення виходу бульб з 22,1% до 105,8 у сорту “Повінь” та з 32,1 % до 118,9 у сорту “Слов’янка”.

Отже, препарат Д-18 перспективний для утворення рослин із розвинутою кореневою системою, а препарат Д-9 – не лише для інтенсифікації отримання мікробульб, але й як стимулятор індукування у вихідних рослин-донорів бульбоутворюючої здатності. Сумісно з гормонами посилює стolonо- і бульбоутворення збільшення кількості сахарози в живильному середовищі та культивування живців в темноті (метод «культури одного вузла»).

3.6. Використання гіберелінів спільно із цитокинінами в культурі тканин

Відомо, що цитокиніни прискорюють ріст ізольованих органів [19, 56]. Але обробка інтактних рослин цитокинінами в більшості випадків спричиняє інгібування їх росту [205]. Тому для кращого розуміння причини протилежної реакції рослинних експлантів і рослин *in vivo* на цитокиніни необхідно враховувати їхню взаємодію з іншими фітогормонами. Про взаємовплив гормонів у науковій літературі існує багато експериментальних даних [56, 73, 78],

Наприклад, ефект ендогенного цитокиніну визначається балансом між його активною дією на процеси, що відбуваються в пагоні, та інгібуючою дією на коріння. Г.Р. Кудоярова із співавторами [71] пояснюють таке зниження надходження ауксинів в корені наявністю цитокинінів. У випадку низьких концентрацій цитокиніну (БАП) вони спостерігали домінуючий ріст пагонів, що призводило до накопичення біомаси рослини. Але у випадку високих концентрацій речовин-інгібіторів росту коренів відбувалося зниження швидкості росту рослин.

На взаємодію гормонів впливає ряд інших факторів [56, 73, 127], зокрема мінеральне живлення [205]. Так, вплив гіберелінів (ГК₃) на вміст цитокинів сильніше проявлявся за умови додаткового внесення азоту, тоді як на вміст АБК при недостатці цього елемента. Це може бути пов’язано з наявністю спільних попередників в біосинтезі цитокинінів і АБК [58]. І як наслідок, вплив гіберелінів на співвідношення цитокинінів і АБК змінюється по-різному, залежно від рівня живлення.

Відкриття гіберелінів, як стверджував академік М. Х. Чайлахян, змусило заново переглянути теорії росту та розвитку рослин, дію світла на рослини, теорії генетичної та фізіологічної карликовості, ростових кореляцій, загального морфогенезу рослин [165].

Гібереліни, як порівняти із цитокинінами та ауксинами, рідше використовуються в культурі рослинних тканин. У деяких випадках гіберелову кислоту вносять в середовище разом із ауксинами і цитокинінами для культури пагонів, особливо на ранніх стадіях. Цей спосіб використовується для ініціації росту експлантів, взятих зі зрілих частин деревних, а також для поліпшення росту й збільшення кількості пагонів троянди і камелії [78].

Нами в дослідженні з трьома видами деревних рослин (*Ilex aquifolium*, *Ilex meserrveae*, *Citrofortunella microcarpa*) успішно використовувався гіберелін для нівелювання фітотоксичного впливу цитокинініну (БАП) при перших асептичних культивуваннях. Додавання гібереліну збільшувало висоту пагона (табл. 3.15, рис. 3.18, і 3.19), а в *C. microcarpa* збільшувалася довжина листків. Крім цього, зростав відсоток приживання експлантів. Особливо це спостерігалось з *I. aquifolium*. Зростання показника було з 8 до 74 %.



Рис. 3.18. Нівелювання токсичного впливу на регенеранти падуба гостролистого сорту “Срібна королева” (*Ilex aquifolium Silver-Queen*) надлишкової концентрації цитокинінінів у живильному середовищі з додаванням гібереліну: 1. БАП 2,5 мг/л; 2. БАП 2,5 мг/л + гіберелін 2,5 мг/л.



Рис. 3.19. Нівелювання токсичного впливу на регенеранти *Citrofortunella microcarpa* надлишкової концентрації цитокинінінів додаванням у живильне середовище 2,5 мг/л гібереліну: БАП 2,5 мг/л; 2. БАП 2,5 мг/л + гіберелін 2,5 мг/л

Однак при за повторних субкультивуваннях на середовищах із гібереліном відмічалось пригнічення розвитку регенерантів. Тому ми вважаємо, що гіберелін доцільно застосовувати при перших асептичних культивуваннях для покращення адаптації рослин до умов *in vitro*.

Успішне використання гібереліну відзначено також для введення в асептичні умови експлантів *Plex meserrveae*, що знаходилися в стані спокою (рис. 3.20). Це дозволило на другий тиждень їхнього культивування спостерігати пробудження бруньок та подальший активний ріст.

Таблиця 3.15.

Вплив гібереліну (2,5 мг/л) на ріст та розвиток регенерантів, 30 день культивування

Вид рослин	Висота регенеранту, мм		Довжина найбільшого листка, мм		Прижилося експлантів, %	
	БАП *	ГК**	БАП	ГК	БАП	ГК
<i>Plex aquifolium Silver-Queen</i>	27	35	7	16	8	74
<i>Plex meserrveae Blue Angel</i>	18	29	12	19	13	77
<i>Citrofortunella microcarpa</i>	7	21	14	31	56	89

*Примітка: БАП - 2,5 мг/л; ГК** - БАП 2,5 мг/л + гіберелін 2,5 мг/л

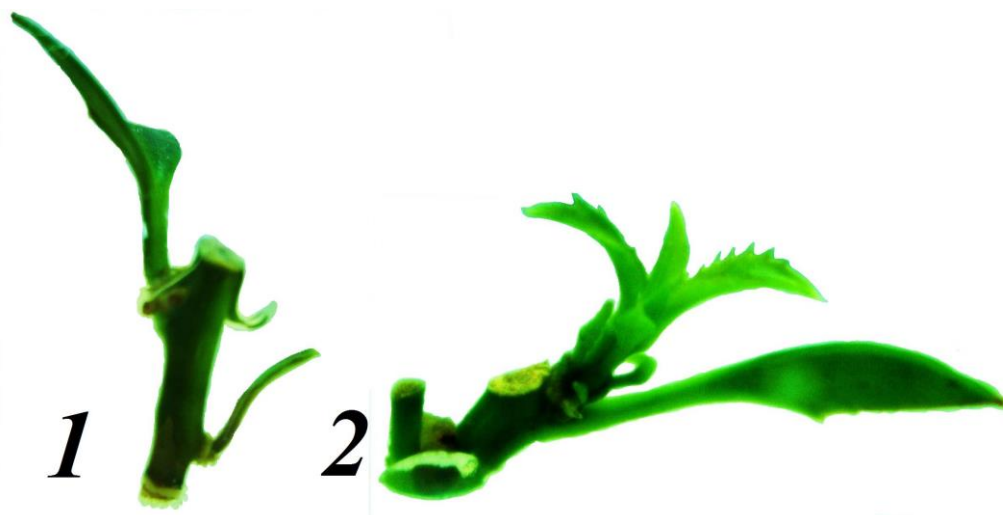


Рис. 3.20. Вплив гібереліну на пробудження бруньок в первинних експлантів падубу Мезерва Голубий ангел (*Plex meserrveae Blue Angel*) на 15 день культивування: 1. Контроль (без додавання гібереліну); 2. Додавання 2,5 мг/л гібереліну

При перших культивуваннях після введення експланта в асептичні умови відбувається адаптація рослинних організмів до умов *in vitro*. У таких умовах набуття ювенільності може відбуватися за умови двох-трьох субкультивувань. Наприклад, нами під час введення в асептичні умови експлантів троянди (сорт “Flamingo”) відмічалася поява в регенерантів бутонів та квітів (рис. 3.21). Тобто за перших культивувань в рослин зберігався притаманний в нативних умовах закономірний перехід від ювенільного до генеративного етапів онтогенезу.

Вважаємо, що такий хід онтогенезу регенерантів значною мірою детермінувався гормональним статусом вихідних рослин, які були взяті в нативних умовах. У другому і третьому поколінні, що вирости *in vitro*, майже не утворювалися квіти, тобто втрачався детермінуючий вплив гормонального статусу вихідних рослин *in vivo*. Регенеранти не переходили до утворення генеративних органів, а натомість інтенсивно формували корені та бічні пагони. Інтенсивне утворення вегетативних органів є типовою ознакою ювенільного періоду розвитку рослинного організму.

Згідно з нашими дослідженнями гібереліни можуть вповільнювати ювенілізацію матеріалу *ex vivo*. У випадку додавання в живильні середовища для регенерації експлантів троянди гіберелінів у кількостях 2 мг/л, порівнюючи з контролем без гібереліну, спостерігалось більше регенерантів із генеративними органами (табл. 3.16, рис. 3.22).

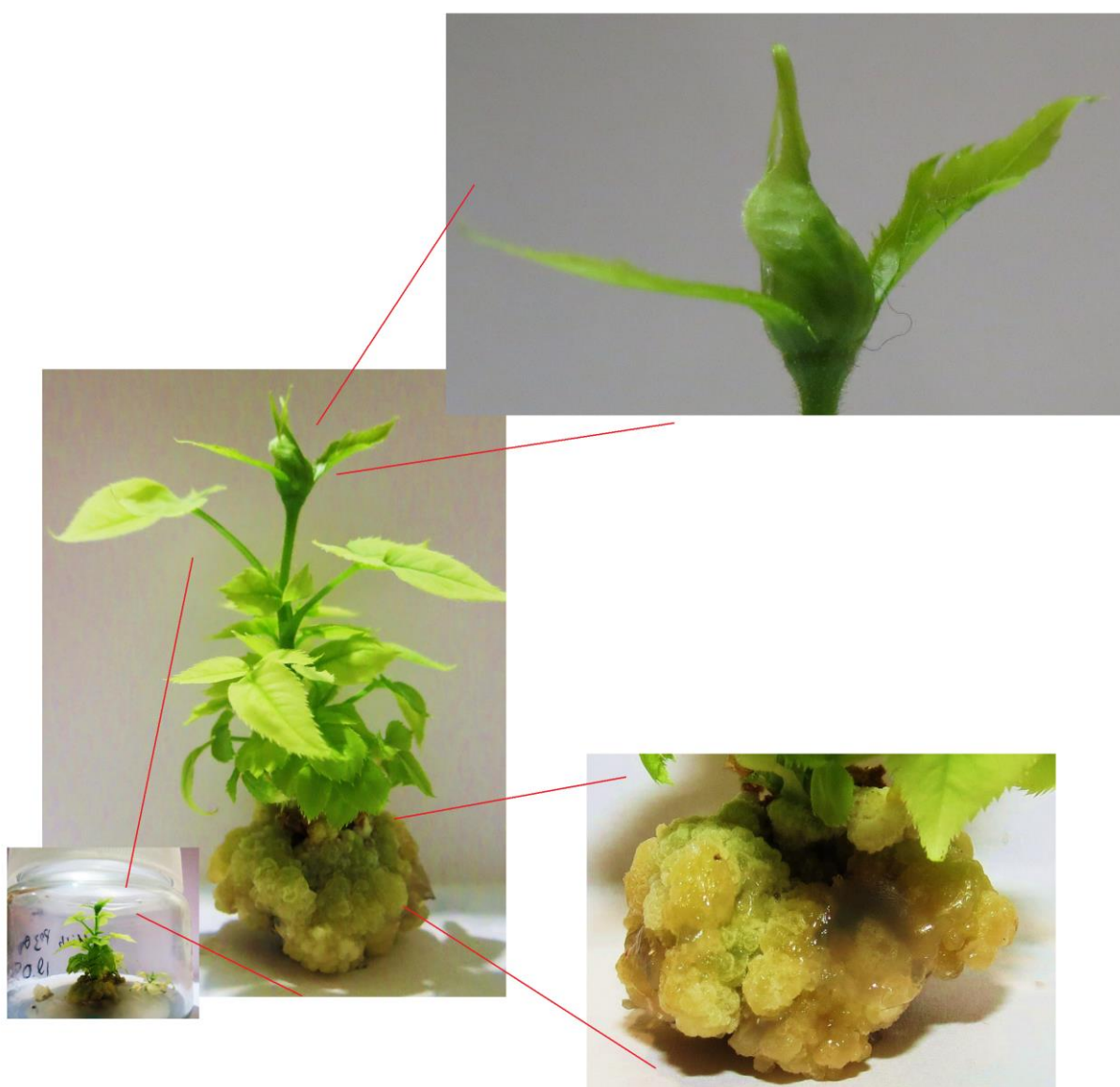


Рис. 3.21. Генеративний період у регенерантів троянди за перших асептичних культивувань

Таблиця 3.16.

Вплив гібереліну на морфогенез *in vitro* первинних експлантів троянди, сорт “Flamingo”

Уміст гібереліну в середовищі, мг/л	Прижилося регенерантів, %	Кількість утворень на регенеранті, шт.	
		пагонів	коренів
0 (контроль)	83	6,3	2,9
2	97	2,6	-
3	91	1,8	-

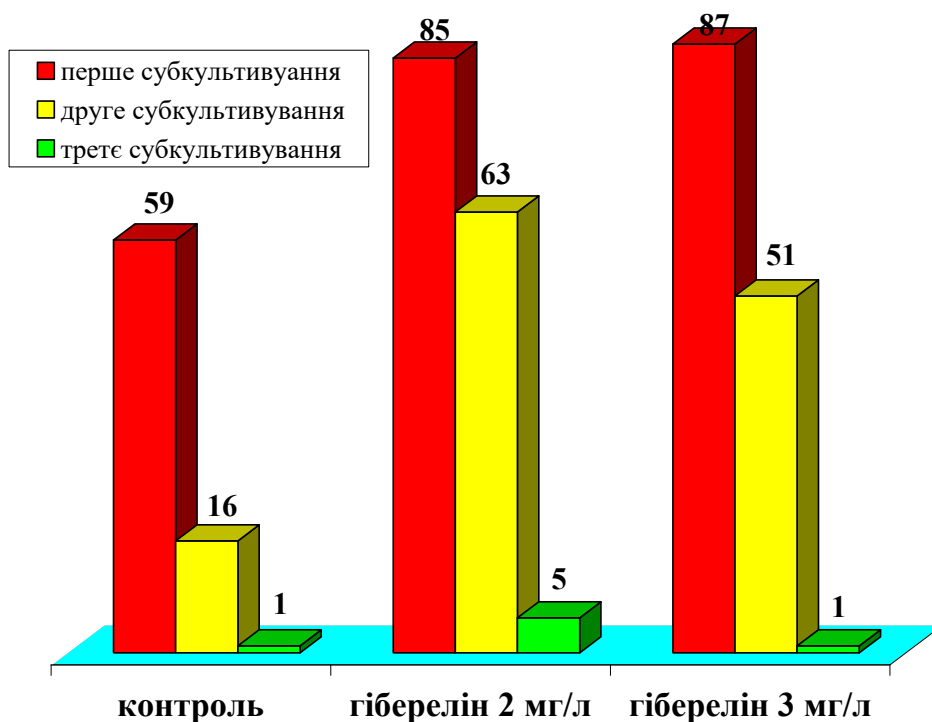


Рис. 3.22. Вплив гібереліну та кількості асептичних живцювань на утворення регенерантами троянди генеративних органів, сорт “Flamingo”

Отже, вважаємо, що додавання гіберелінів у живильні середовища має такі впливи на регенеранти: 1. нівелює фітоксичну дію високих концентрацій цитокінінів; 2. сприяє пробудженню первинних експлантів експлантів, що знаходилися в стані спокою; 3. вповільнює ювенілізацію регенерантів троянди при перших асептичних культивуваннях

IV. 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 поетапно: розвиваються ті ознаки і властивості, які необхідні організму на даний час і є сприятливі умови для їх проявлення.

Окрім гормональної регуляції онтогенезу важливе значення має 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 складових, але й те, наскільки вони доступні.

4.1. Ріст і розвиток рослин картоплі *in vitro* залежно від сорту і консистенції середовища

Окремими авторами встановлено, що за вирощування рослин картоплі *in vitro* на рідкому середовищі покращується їх ріст, збільшується кількість міжвузлів. Рідке середовище поліпшує ріст пагонів, збільшуючи довжину міжвузлів. Відмічалось, що це відбувається внаслідок посиленого поглинання сахарози і азоту з рідкого середовища. Одночасно збільшується вміст сухої речовини в пагонах і коренях [36, 143].

Нами також досліджувався вплив консистенції середовища на морфологічні особливості регенерантів (табл. 4.1). Оскільки встановлено [67, 92], що зони стебла, Таблиця. 4.1.

Ріст та розвиток рослин картоплі *in vitro* залежно від сорту і консистенції середовища

Сорт	Середовище*	Довжина пагона, мм	Приріст пагона, мм	Кількість міжвузлів, шт.	Середня довжина, міжвузля, мм	Довжина кореневої системи, мм	Приріст кореневої системи, мм	Ступінь розвитку кореневої системи, бал
7 днів								
Подолянка	Р	40,5	–	4,0	10,1	3,5	–	1,5
Подолянка	А	25,1	–	2,6	9,7	5,5	–	2,8
Забава	Р	50,5	–	3,9	12,9	5,3	–	1,7
Забава	А	29,7	–	2,7	11,0	7,6	–	3,5
НР ₀₅		0,7	–	0,1	–	0,3	–	0,1
14 днів								
Подолянка	Р	77,9	37,4	6,0	12,2	8,8	5,3	2,0
Подолянка	А	59,8	34,7	4,7	12,7	14,8	9,3	2,8
Забава	Р	105,0	54,5	4,6	22,8	17,5	12,2	3,0
Забава	А	70,2	40,5	3,6	19,5	19,7	12,1	4,1
НР ₀₅		0,9	–	0,1	–	0,5	–	0,1
21 день								
Подолянка	Р	145,4	72,6	8,1	18,0	20,7	11,9	3,5
Подолянка	А	99,3	39,5	6,1	16,3	29,6	14,8	4,1
Забава	Р	132,1	27,1	6,1	21,7	29,0	11,5	4,1
Забава	А	86,6	16,4	5,8	14,9	34,9	15,2	4,5
НР ₀₅		0,6	–	0,1	–	0,5	–	0,1

*Примітка: Р – рідке поживне середовище; А – агаризоване поживне середовище

різні за онтогенетичним віком, а отже обумовлюють неоднакові темпи розвитку регенерантів, для закладання досліду використовували живці з середньої частини стебла.

У результаті дослідження підтверджено тенденції впливу консистенції середовища та сортових особливостей на інтенсивність розвитку регенерантів із живців за МКР картоплі. На рідкому середовищі рослини *in vitro* сортів Подолянка, Забава мали більшу висоту пагона, кількість міжвузль та їх довжину. Величина кореневої системи та ступінь її розвитку у обох сортів мали вищі значення показників за культивування регенерантів на агаризованому середовищі. Рослини сорту Подолянка характеризувались кращими темпам розвитку, порівняно із сортом Забава. Можливо це пов'язано з тим, що сорт Подолянка ранньостиглий, а сорт Забава - середньостиглий [65]. Консистенція живильного середовища та сорт як фактори впливу на ріст та розвиток рослин картоплі підтверджено на 7, 14 і 21 день після черенкування.

Отже, рідке живильне середовище, порівняно з агаризованим, покращує розвиток пагона, але обумовлює утворення менш розвиненої кореневої системи. Вважаємо, що в рідкому середовищі елементи живлення є більш доступними, порівняно з агаризованим, і як наслідок, пагін швидше розвивається. Проте, у рідкому середовищі має місце більша доступність елементів живлення, що створює “менший запит” на розвиток коренів.

4.2. Використання різних гелеутворювачів для штучних живильних середовищ на регенерацію та бульбоутворення *in vitro* рослин картоплі з живців

Культивуючи живці рослин картоплі на твердих середовищах *in vitro* в яких загущувачами слугували агар (контроль), картопляний крохмаль, картопляний екстракт та перліт встановили відмінності в рості й розвитку регенерантів залежно від варіантів (табл. 4.2).

Пробіркові рослини, що вирости на картопляному екстракті, порівняно з контролем, мали нижчу висоту стебла, однак в них відмічена більша здатність утворювати столони та мікробульби. У цьому варіанті також повільніше розвивалися регенеранти. У сорту Подолянка подовжувався період культивування до 139 днів, що на 52 дні довше, ніж у контролі. За посадки живців на таке середовище найбільш повільні темпи регенерації відмічено в перші дні.

Викладене може бути пов'язано з тим, що в картопляному екстракті вуглеводи знаходяться у вигляді полісахаридів, а в контролі використовувалася сахароза, яка є більш доступною для метаболічних процесів [53]. Встановлені залежності в сорту Подолянка підтверджені також у сорту Забава.

Виявлено також вплив сорту як на процеси регенерації, так і бульбоутворення. Регенеранти сорту Подолянка, порівняно з сортом Забава, відрізнялися меншими розмірами пагонів і кореневої системи та мали коротший період культивування. Також у сорту Подолянка швидше розпочиналося бульбоутворення. Тобто, біологічні особливості сортів, які характерні в нативних умовах, підтверджувалися і в асептичних.

Як відомо, висока концентрація в живильному розчині вуглеводів прискорює столоно- та бульбоутворення [135, 138]. Регенеранти на картопляному екстракті формували мікробульби, а у випадку культивування в темноті мікробульби утворювалися без формування регенерантом стебла (рис. 4.1).

Таблиця 4.2.

Вплив гелеутворювачів у штучних живильних середовищах на регенерацію *in vitro* рослин картоплі з живців

Гелеутворювач (загущувач)	Висота пагона, мм	Довжина кореневої системи, мм	Наявність, шт.		Період від живцювання до початку бульбоутворення, днів	Період культивування, днів	
			столонів	бульб		всього	± до контролю
Сорт Подолянка							
Агар	178,3	65,5	1,2	0,9	44,1	87,1	-
Картопляний екстракт	123,4	32,1	1,8	1,5	7,3	139,0	+52
Картопляний крохмаль	148,1	74,9	1,9	1,4	12,9	95,1	+8
Перліт	103,2	68,3	1,1	0,9	10,5	63,3	- 23,8
НІР ₀₅	8,6	5,4	0,1	0,1	2,7	6,1	-
Сорт Забава							
Агар	192,0	79,0	1,3	1,2	49,6	132,5	-
Картопляний екстракт	157,1	38,7	2,7	1,7	14,5	159,9	+27,4
Картопляний крохмаль	165,9	86,7	3,3	2,6	17,8	147,9	+15,4
Перліт	112,5	71,2	1,6	0,9	12,3	65,7	- 66,8
НІР ₀₅	8,9	6,4	0,3	0,1	2,9	5,8	-

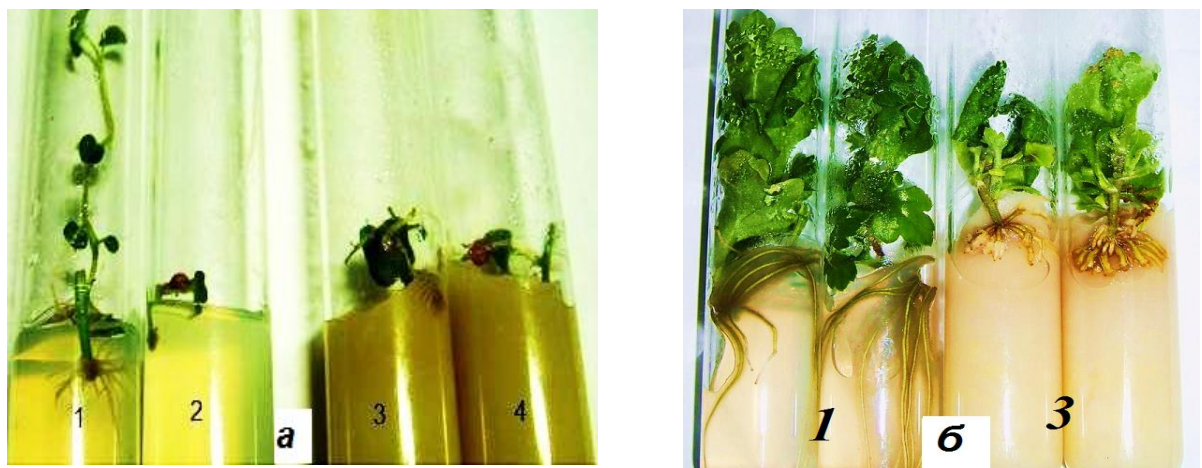


Рис. 4.1. Регенерація рослин картоплі (а) і хризантем (б) *in vitro* на середовищах з агаром та картопляним пюре 1. Агаризоване середовище, вирощування на світлі (контроль); 2. Агаризоване середовище вирощування в темноті; 3. Картопляне пюре (вирощування на світлі); 4. Картопляне пюре (вирощування в темноті).

Середовище на основі картопляного екстракту було апробовано за культивування *in vitro* хризантем. У цьому випадку у регенерантів хризантеми був вповільнений ріст та відсутнє апікальне домінування. Коренева система була короткою і потовщеною (рис. 4.1.б). Крім нас, середовища на основі картопляного екстракту використовували й інші дослідники, зокрема для культивування пиляків озимої пшениці *in vitro* [98].

За МКР картоплі середовища на основі картопляного екстракту є економічно перспективним, оскільки дозволяє уникати затрат на агар та сахарозу. В промисловому МКР використовують також як заміник агару – крохмаль (5% від маси середовища) [78]. У наших дослідженнях такі середовища забезпечували добру регенерацію рослин картоплі (рис. 4.2, 4.3). За зовнішнім виглядом регенеранти, отримані на крохмальному середовищі, порівняно з контролем, мали коротше, але товсте стебло та широкі добре розвинені листкові пластинки. Однак, середовище приготовлене на основі картопляного крохмалю часто мало неоднорідну консистенцію і розшаровувалось на рідку верхню частину та густу нижню частину. Регенеранти на середовищі із крохмалем, як і у випадку із середовищем на основі картопляного екстракту, порівняно з контролем, швидше розпочинали формувати мікробульби.

У випадку заміни агару перлітом (рис. 4.4) у регенерантів відмічено короткий період культивування та швидше бульбоутворення. Середовища з перлітом швидко втрачали вологу, а її нестача є стресовим фактором для рослини. За дії стресу рослини швидше завершують онтогенез [83]. Додавання води в середовища технологічно ризиковане через ймовірність втрати асептичності.



Рис. 4.2. Регенерація живців картоплі *in vitro* залежно від субстрату (сорт Подолянка)

1. середовище з додаванням 0,7 % агару

2. середовище з додаванням 5 % крохмалю.



Рис. 4.3. Будьбоутворення картоплі *in vitro* на середовищі з додаванням 7 г/л агару (сорт Подолянка)



Рис. 4.4. Будьбоутворення картоплі *in vitro* на середовищі з додаванням перліту (сорт Подолянка)

4.3. Вплив мінеральної основи штучних живильних середовищ на онтогенез рослин *in vitro*

Живильне середовище – головний фактор, що обумовлює успіх МКРР [73, 78]. Основою усіх середовищ є мінеральні солі. Наприклад, за різного вмісту макросолей в середовищі (табл. 4.3) регенеранти троянди мали неоднаковий морфогенез. Використання середовища Lloyd and McCown, яке, порівняно з середовищем MS, містить меншу кількість азоту, зменшувало кількість пагонів в куці але збільшувало їх висоту та покращувало ризогенез (табл. 4.4). В даному випадку кількісний та якісний склад макросолей детермінує онтогенез з різними особливостями; тобто MS стимулює утворення бічних пагонів і його доцільно використовувати для прискороного нарощування кількості матеріалу *in vitro*, а середовище Lloyd and McCown сприяє апікальному домінуванню та ризогенезу, тому його краще застосовувати для регенерації рослин перед висадкою *in vivo*.

Таблиця 4.3.

Використання макроелементів у живильному середовищі для МКР троянди

*MS		Lloyd and McCown	
NH ₄ NO ₃	1650,0	NH ₄ NO ₃	400,0
KNO ₃	1900,0	K ₂ SO ₄	980,0
KH ₂ PO ₄	170,0	KH ₂ PO ₄	170,0
MgSO ₄ x7H ₂ O	370,0	MgSO ₄ x7H ₂ O	370,0
CaCl ₂ x2H ₂ O	440,0	CaCl ₂ x2H ₂ O	96,00
		Ca(NO ₃) ₂ x4H ₂ O	556,0

* Примітка: прописи згідно Г.П.Кушнір, В.В. Сарнацька [78].

Основними перевагами МКРР є отримання високих коефіцієнтів розмноження, коротких періодів субкультивування та вирівняних за розмірами і розвитком регенерантів. Одними із основних детермінант, від яких залежать ці показники, є мінеральне живлення та екзогенні фітогормони. Трофічний детермінуючий вплив також встановлено на МКР представників роду *Actinidia* (рис. 4.5).

Таблиця 4.4.

Вплив різного вмісту макросолей на морфогенез регенерантів троянди, сорт Flamingo

Пропис макросолей	Висота пагона, мм	Кількість утворених на регенеранті, шт.	
		пагонів	коренів
MS	45	6,3	2,9
Lloyd and McCown,	79	2,1	4,7

*A. deliciosa* сорт Hayward*A. arguta* сорт ОригінальнаРис. 4.5. Представники роду *Actinidia in vitro*

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

Нами встановлено неоднаковий коефіцієнт розмноження (кількість мікропагонів у конгломераті, який утворився при знятті апікального домінування) різних за вмістом живильних речовин середовищ при сталій кількості цитокініну (1,5 мг/л БАП) (табл. 4.5).

Під час культивування випробувано 5 варіантів живильних середовищ, які відрізнялися мінеральною частиною: MS; Куаріна і Лепувра (далі QL); Маккоула і Лойда (далі WPM) [78]; середовище Мурасіге і Скуга у власній модифікації (далі МК). Модифікація передбачала зміни у кількостях макроелементів (NH_4NO_3 1250 мг/л; KNO_3 1100 мг/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 770 мг/л; KH_2PO_4 970 мг/л; CaCl_2 замінено на $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 440 мг/л; залізо та хелатуючий агент замінили на Ферилен Fe-EDDHA (залізо італійської фірми Valagro) у кількості 183,4 мг/л

Найбільша кількість мікропагонів була в конгломератах, що вирости на модифікованому нами середовищі (МК). Зокрема, в сорту Оригінальна кількість мікропагонів була від 3,1 шт. (WPM) до 5,7 шт. (МК). Варіант QL наближався до варіанту із модифікованим середовищем - 4,3 шт. Встановлено вплив біологічних особливостей досліджуваних об'єктів на кількість мікропагонів у конгломераті. Найбільше мікропагонів - 3,7 - 5,7 шт. на конгломерат було в сорту Оригінальна (*A. arguta*), найменше – сорту Atlas (1,3-2,9 шт.).

Таблиця 4.5

Вплив живильного середовища на кількість мікропагонів у конгломераті, шт.

Середовище	Ботанічний вид						
	<i>A. arguta</i>		<i>A. chinensis</i>			<i>A. deliciosa</i>	
	Сорт/ форма						
	Оригінальна	Scarlet september	ж.форма №1	ж.форма №2	Чол. Форма	Hayward	Atlas
MS	3,7±0,3	3,2±0,4	2,3±0,4	2,0±0,2	2,6±0,3	2,3±0,2	2,0±0,3
QL	4,3±0,3	4,0±0,4	2,6±0,3	2,7±0,3	3,0±0,4	2,8±0,3	2,4±0,2
WPM	3,1±0,4	2,2±0,4	1,8±0,3	1,4±0,4	1,3±0,3	1,9±0,5	1,3±0,5
МК	5,7±0,6	5,3±0,2	3,4±0,2	3,6±0,3	3,2±0,4	3,3±0,5	2,9±0,4

Також порівнювали два типи живильних середовищ за МКР картоплі: MS - класичне середовище за прописом; Ні - це ж середовище, але в модифікації Інституту картоплярства НААНУ. Відмінності в складі цих середовищ наведені в таблиці 4.6.

Таблиця 4.6.

Порівняння складу класичного середовища MS і модифікованого в Інституті картоплярства НААНУ (Ні)

Компонент*	MS	Ні	Компонент	MS	Ні
NH ₄ NO ₃	1650	1250	FeSO ₄ x7H ₂ O	27,8	27,8
KNO ₃	1900	1100	Na ₂ EDTAx2H ₂ O	37,3	37,3
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	-	440	Тіамін-НСl	0,1	0,1
CaCl ₂ x2H ₂ O	440	-	Піридоксин-НСl	0,5	0,5
MgSO ₄ x7H ₂ O	370	770	Вітамін С	-	1,6
KH ₂ PO ₄	170	970	Нікотинова кислота	0,5	-
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	Мезоінозит	100	-
MnSO ₄ xH ₂ O	22,3	22,3	Гліцин	2,0	-
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025	0,025	ІОК	2,0	1,0
CuSO ₄ xH ₂ O	0,025	0,025	Кінетин	0,2	
ZnSO ₄ x7H ₂ O	8,6	8,6	Сахароза	30000	30000
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,25	0,25	Агар	70	70
KJ	0,83	0,83	рН 5,6–5,8		

*Примітка: склад компонентів наведено в мг/л

Відмінності в складі живильного середовища вплинули на онтогенез рослин картоплі *in vitro*. Регенеранти, вирощені на модифікованому середовищі Ні, з вмістом 3% сахарози істотно не відрізнялися від класичного, за висотою рослин. Прояв інших показників був вищим у обох сортів у досліджуваному варіанті (табл. 4.7). Виняток становив розвиток кореневої системи.

Таблиця 4.7.

Вплив мінеральної основи штучних живильних середовищ на регенерацію рослин картоплі *in vitro* на 14 день культивування

Варіант	Висота рослин, мм	Кількість міжвузль, шт.	Розвиток листкової пластинки, бал	Розвиток кореневої системи, бал	Всього період культивування, діб
Сорт Подолянка					
MS	62,1	3,9	3,0	4,1	45,1
Ні	59,8	4,7	4,2	3,4	33,0
Сорт Забава					
MS	71,4	3,1	3,7	4,5	58,6
Ні	70,2	3,6	4,5	3,2	46,2
НІР ₀₅	2,7	0,2	0,3	0,2	3,4

За збільшення концентрації сахарози до кількості індукуючої бульбоутворення (в наших дослідженнях це було 6%) у обох досліджуваних сортів відмічено швидше настання процесів столоно- та бульбоутворення за використання модифікованого середовища (табл. 4.8). Зокрема, в сорту Подолянка столоноутворення розпочалося на 6,5 днів раніше, а в сорту Забава – на 6,7 днів.

Таблиця 4.8.

Вплив мінеральної основи штучних живильних середовищ на бульбоутворення рослин картоплі *in vitro*

Варіант	Тривалість періоду (діб) від живцювання до:		Утворилося бульб на 100 регенерантів, шт.		Період культивування, діб
	початку столоноутворення	початку бульбоутворення,	всього	Ø>8 мм	
Сорт "Подолянка"					
MS	35,8	43,1	112,4	79,0	83,5
Ні	29,3	37,3	119,7	86,4	67,7
Сорт "Забава"					
MS	46,3	48,8	126,2	73,2	131,4
Ні	39,6	45,6	129,4	93,1	115,3
НІР ₀₅	2,3	2,7	6,2	5,9	6,1

Утворення мікробульб також прискорювалося на середовищі "Ні". Крім цього, різниця між варіантами була більшою, ніж за "столоноутворення". Регенеранти сорту Подолянка на модифікованому середовищі на 5,8 днів швидше започаткували утворення бульб. Відповідне відмічено і в сорту Забава.

Отже, прискорення процесів столоно- та бульбоутворення є не що інше, як прискорення розвитку. Порівнюючи два варіанти середовищ, можна відмітити, що модифіковане прискорює розвиток регенерантів. Це не протирічить загальноприйнятим закономірностям: “надлишок азоту затримує розвиток, а фосфор його прискорює”. В модифікованому середовищі (Ні) співвідношення азот/фосфор менше, ніж у контролі (MS).

4.4. Вплив концентрації заліза в штучних живильних середовищах на ріст рослин *in vitro*

Залізо входить в ряд ферментних систем, від яких залежить ціла низка метаболітичних процесів. Це, зокрема, синтез хлорофілів, відновлення нітратів. Залізо не підлягає реутилізації. Цим пояснюється той факт, що хлороз здебільшого властивий листкам верхніх ярусів. Якщо рослини не вбирають заліза впродовж тривалого часу, то листки стають бурими, а потім відмирають [19].

У живильних середовищах Fe найчастіше міститься у вигляді хелату з етилендіамінтетраацетатом (ЕДТА). В універсальному й найбільш відомому прописі за Мурасіге і Скугом та рядом інших додають $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,80 мг/л (0,1 М) сумісно із 37,30 мг/л хелатного агента Na_2EDTA [56]. Для одних культур такий уміст дає задовільні результати, а в інших – спостерігаються хлорози. Збільшення вмісту $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + Na_2EDTA часто призводить до появи регенерантів із гіпергідратованими тканинами [104, 105]. Це та поява нових хелатних форм заліза обумовлює пошук оптимальних концентрацій Fe в живильних середовищах. Для цього досліджували асептичну культуру 3 сортів ожини (Reuben, Triple crown, Loch Tay) та 3 сортів малини (Glen Ample, Octavia, Sugana), які отримали із введенням в середовище за Мурасіге і Скугом із біоцидом PPMTM 2 мл/л. Оскільки раніше для вказаних сортів рослин були підібрані концентрації цитокініну бензіламінопурину (БАП) в середовищах для ожини додавали 0,2 мг/л БАП та 1 мг/л БАП для малини [105]. У дослідях порівняно ефективність застосування різних концентрацій суміші $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + хелатного агента Na_2EDTA і нове добриво Ferrilene 4.8 Orto – Orto із вмістом ньому Fe у формі Orto – Orto 4,8% та загальним вмістом заліза 6 %. Ця речовина містить раніше менш поширений хелатуєчий в прописах агент EDDHA або етилендіамін-N, N'-біс (2-гідроксіфенілоцтової кислоти) і стандартний Na_2EDTA . Кількість добрива розраховували за молярною масою заліза, що відповідала 0,1 М – 27,80 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (згідно з прописом Мурасіге і Скуга). За вмістом Fe цій кількості екваленто 91,7 мг/л добрива. Оскільки добриво містило в собі хелатуєчі агенти, у варіантах із ним додатково Na_2EDTA не добавляли. Випробували наступні концентрації заліза: 1. контроль (100 відсотків за прописом Мурасіге і Скуга) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,80 + 37,30 мг/л Na_2EDTA ; 2. 125 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 34,75 + 46,63 мг/л Na_2EDTA ; 3. 150% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 41,7 + 55,95 мг/л Na_2EDTA ; 4. 200% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 55,6 + 74,6 мг/л Na_2EDTA ; 5. 250% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 69,5 + 93,25 мг/л Na_2EDTA ; 6. Ferrilene 4.8 Orto – Orto 91,7 мг/л (100%); 7. Ferrilene 4.8 Orto – Orto 114,63 мг/л (125%); 8. Ferrilene 4.8 Orto–Orto – 137,55 мг/л (150%); 9. Ferrilene 4.8 Orto–Orto 183,4 мг/л (200%); 10. Ferrilene 4.8 Orto–Orto – 229,25 (250%).

Висоту рослин визначали за найвищим пагоном в конгломераті. Кількості пагонів у конгломераті вираховували за числом мікропагонів, які мали два і більше міжвузля. До вітрифікованих відносили регенеранти, в яких візуально мали 50 і більше відсотків гіпергідратованих тканин; до числа рослини із ознаками хлорозу враховували ті, що містили 50% і більше листків верхніх двох міжвузлів з жовтим та світло-салатовим забарвленням.

У регенерантів ожини за на варіантах із концентрацією заліза, які передбачена стандартним прописом MS, у сорту “Reuben” було 68% рослин із хлорозами на листових пластинках (табл. 4.9, рис. 4.6), у сорту “Triple crown” їх виявилося 11%, а в сорту “Loch Tay” не було. Тобто вважаємо, що існує сортова реакція на концентрацію заліза. Збільшення вмісту хелатного заліза до 125% у вигляді хелату із Na₂ЕДТА хоч і в незначній мірі, але збільшувало кількість мікропагонів в конгломераті. Для двох досліджуваних сортів оптимальною була форма хелату заліза в кількості 150 % від пропису MS. Більші концентрації Fe з вказаним хелатуючим агентом зумовлювало появу регенерантів із ознаками вітрифікації.

Таблиця 4.9.

Вплив форм та концентрацій заліза на особливості регенерації рослин ожини на стадії розмноження

Концентрація, %	Хлоротичних рослин, %			Вітрифікованих рослин, %			Мікропагонів в конгломераті, шт.		
	*R	T	L	R	T	L	R	T	L
FeSO ₄ x7H ₂ O + хелатного агента Na ₂ ЕДТА (стандарт)									
100	68	11	-	-	-	-	1	1	1,2
125	7	2	-	-	-	2	1,3	1,1	1,7
150	-	-	-	4	-	39	1,6	1,3	1,3
200	-	-	-	45	24	100	1,3	1,2	1,1
250	-	-	-	100	61	100	1,1	1,2	0,9
Ferrilene 4.8 Orto – Orto									
100	7	1	-	-	-	-	1,4	1,2	1,6
125	2	-	-	-	-	-	2,1	1,5	1,9
150	-	-	-	3	-	16	5,3	3,2	1,7
200	-	-	-	15	11	84	5,0	3,7	1,3
250	-	-	-	89	42	100	2,1	1,4	1,1

*Примітка: скороченням відповідають назви сортів ожини: «R» - Reuben, «T» - Triple crown, «L» - Loch Tay



Рис. 4.6. Відхилення в розвитку регенерантів ожини сорту Reuben: 1 – хлороз верхніх листків; 2 – вітрифікація.

У випадку застосування Ferrilene 4.8 Orto – Orto, порівняно із стандартною формою, менша кількість хлоротичних рослин була, як за кількістю заліза, рекомендованою в прописі MS, так із збільшенням до 125 і 150%. У варіанті із 150 відсотками Ferrilene 4.8 Orto – Orto відмічено найбільшу кількість мікропагонів у конгломераті, зокрема, в сорту “Reuben” – 5,3 шт. Подальше збільшення вмісту заліза, як і у варіантах із стандартним хелатуючим агентом, підвищувало відсоток вітрифікованих регенерантів (табл. 4.10).

Чутливими до нестачі заліза виявилися всі три сорти малини. У стандартній його формі від 100 до 150% до вмісту, згідно з прописом, були ознаки хлорозу: від 100 до 11% залежно від сорту та концентрації. З використанням нової форми хелатного заліза в кількості 150% хлорози були відсутніми.

Таблиця 4.10.

Вплив форм та концентрацій заліза на особливості регенерації рослин малини на стадії розмноження

Концентрація, %	Хлоротичних рослин, %			Вітрифікованих рослин, %			Мікропагонів в конгломераті, шт.		
	Сорти	G*	O	S	G	O	S	G	O
FeSO₄x7H₂O + хелатного агента Na₂ЕДТА									
100	97	100	93	-	-	-	1,3	1,1	1,9
125	49	58	42	-	-	-	2,9	2,8	2,7
150	17	13	11	-	-	-	4,3	4,1	4,8
200	-	-	-	1	3	4	6,9	5,8	7,1
250	-	-	-	18	11	32	4,2	4,5	3,7
Ferrilene 4,8 Orto – Orto									
100	48	76	39	-	-	-	1,7	1,4	2,2
125	4	7	4	-	-	-	3,6	4,1	3,9
150	-	1	-	-	-	-	5,0	5,6	5,9
200	-	-	-	-	-	1	7,7	6,8	8,2
250	-	-	-	5	3	8	6,6	5,2	5,9

*Примітка: скороченням відповідають назви сортів малини: «G» - Glen Ample, «O» - Octavia, «S» - Sugana.

Також вказана форма виявилася кращою у випадку застосування більшої кількості Fe (200%). Якщо за стандартного хелатуючого агента при 250 % Fe було від 11 до 32% вітрифікованих регенерантів, то з використанням нового хелатуючого агента їхня кількість знижувалася до 3-8%.

Найбільший уміст мікропагонів в конгломераті відзначено за умови використання 200% обох форм заліза, але з кращим результатом у випадку з новим хелатуючим агентом. Зокрема, найбільше мікропагонів на рослину було в сорту “Sugana” 8,2, що, порівняно зі стандартом, виявилось менше на 1,3 мікропагона. При використанні Ferrilene 4.8 Orto – Orto конгломерати мали 10 і більше мікропагонів (рис. 4.7).



150%: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 41,7 мг/л та Na_2EDTA – конгломерат із 4 мікропагонів



200% : $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 55,6 мг/л та Na_2EDTA – конгломерат під час росту розділювався на дві частини; загальна кількість мікропагонів – 14 шт.

Рис. 4.7. Вплив кількості $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ в живильному середовищі на кількість мікропагонів малини сорту Octavia в конгломераті на 30 день культивування *in vitro*

Отже, для ожини оптимальним є збільшення вмісту хелатного заліза до 150 відсотків або заміна $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ і $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ на 137,55 мг/л Ferrilene 4.8 Orto-Orto. Для малини кращим був варіант збільшення, згідно з прописом MS, вмісту $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ і $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ до 200% або заміна на 183,4 мг/л Ferrilene 4.8 Orto-Orto.

У результаті порівняння ефективності трьох концентрацій хелатного заліза (табл. 4.11) в штучних живильних середовищах за МКР картоплі встановлено таке. Регенеранти, вирощені на середовищах зі збільшеним вмістом заліза, як порівняти з контролем, відрізнялися швидшим столоноутворенням та бульбоутворенням (табл. 4.12).

Таблиця 4.11.

Кількість сульфату заліза та трилону Б ($\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$) в штучному живильному середовищі досліджуваних варіантів.

Варіант концентрації	Компонент	Кількість мг/л
Рекомендована	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
Зменшена на 50%	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	13,9
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	18,65
Подвоєна	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	55,6
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	74,6

Виявлено, що найбільша висота регенерантів та довжина кореневої системи була при рекомендованій кількості заліза в штучному живильному середовищі. Зменшення і подвоєння її зумовлювало зниження значення біометричних показників регенераційного процесу. Візуальним доказом нестачі заліза, що проявлялися у регенерантів, було: дрібні і світло-зелені верхівкові листки, хлоротичні плями на нижніх листках.

Подвійна концентрація заліза створювала умови фітотоксичності. Зокрема, поодинокі регенеранти мали вітрифіковані органи. Прояв дії різних концентрацій заліза значною мірою детермінувався концентрацією сахарози в штучному живильному середовищі. При порівнянні двох її концентрацій: 3% (застосовувалася для живцювання) і 6% (застосовувалася для отримання мікробульб) встановлено, що в останньому випадку прискорюються процеси столоно- та бульбоутворення з одночасним зниженням біометричних показників пагона і кореневої системи.

Таблиця 4.12.

Процеси регенерації та бульбоутворення залежно від кількості заліза в штучних живильних середовищах

Варіант концентрації	Напрямок МКР	Висота рослин на 30 день, см	Довжина кореневої системи, см	Початок утворення, діб	
				столонів	бульб
Сорт "Подольянка"					
Рекомендована	живцювання	23,3	12,1	43,2	56,9
	бульбоутворення	14,5	6,5	29,3	37,3
Зменшена на 50%	живцювання	16,7	9,8	64,2	66,7
	бульбоутворення	12,4	4,3	54,7	67,9
Подвоєна	живцювання	24,1	12,6	39,7	51,5
	бульбоутворення	13,6	6,9	23,2	46,2
НІР ₀₅		0,4	0,2	2,7	2,6
Сорт "Забава"					
Рекомендована	живцювання	25,7	14,4	65,3	69,1
	бульбоутворення	13,5	5,9	39,6	45,6
Зменшена на 50%	живцювання	17,7	10,4	74,3	81,2
	бульбоутворення	15,1	6,1	47,3	75,5
Подвоєна	живцювання	27,1	13,0	45,7	82,3
	бульбоутворення	12,6	6,7	28,2	51,2
НІР ₀₅		0,6	0,4	2,4	3,7

Виявлено вплив різних концентрацій заліза за 6% сахарози на туберизаційні процеси (табл. 4.13). У обох сортів найменша кількість та маса бульб була за умови вирощування регенерантів на середовищах з половинною концентрацією заліза. Протилежне відзначено в рослин, які виростили на середовищі з подвійною кількістю заліза.

Таблиця 4.13.

Утворенням бульб у рослин *in vitro* залежно від концентрації заліза в штучному живильному середовищі

Варіант концентрації	Кількість бульб, шт.		Маса бульб, г	
	Ø>8 мм	всього	середня	з 1 тис. рослин
Сорт “Подольянка”				
Рекомендована	864	1197	0,384	450,65
Зменшена на 50%	316	961	0,231	221,91
Подвоєна	1032	1326	0,396	526,10
НІР ₀₅	41	48	0,15	23,11
Сорт “Забава”				
Рекомендована	931	1294	0,441	570,65
Зменшена на 50%	421	975	0,248	241,80
Подвоєна	987	1487	0,485	724,17
НІР ₀₅	47	59	0,18	31,51

Отже, збільшення вдвічі кількості заліза покращує процеси бульбоутворення, але уповільнює ріст пагона та кореневої системи в регенерантів.

4.5. Особливості онтогенезу рослин картоплі на штучному живильному середовищі, модифікованому у Білоцерківському НАУ

У наших дослідженнях зроблена спроба удосконалення живильного середовища для живцювання рослин картоплі в асептичних умовах. За основу взято середовище за прописом Мурасіге і Скуга, модифіковане Інститутом картоплярства НААНУ. До існуючих модифікацій, нами на основі попередніх експериментальних даних, внесено наступні зміни в прописі середовища: агар і сахароза замінені картопляним крохмалем, який одночасно є згущувачем середовища і джерелом вуглеводів (“*крохмаль = сахароза + агар*”), а кінетин (1 мг/л) замінено збільшенням концентрації аденіну до 20 мг/л. Також вдвічі збільшено концентрацію хелатного заліза.

Оскільки це середовище також планувалося використовувати для культивування декоративних деревних рослин, яким властиве отруєння власними фенольними сполуками, виділеними в поживне середовище, та враховуючи досвід інших авторів [73, 73] і наших досліджень із туюю західною [101], міскантусом [29], у середовище введено підвищену концентрацію (25 мг/л) аскорбінової кислоти як адсорбента фенолів та кофермента ряду ферментів, зокрема, задіяних в бульбоутворенні [95].

Під час випробовування нової модифікації середовища для отримання мікробульб, за базове (контрольне) взято середовище Мурасіге і Скуга в модифікації Інституту картоплярства НААНУ (агаризоване, 6% сахарози) [66]. При культивуванні рослин встановили такі відмінності в регенераційному та туберизаційних процесах (табл. 4.14).

Онтогенез регенерантів на середовищі в модифікації лабораторії біотехнології БНАУ відрізнявся від контролю (базової модифікації) співвідношенням росту і розвитку, тобто кількісними і якісними змінами в рослин під час їх життєвого циклу. При новій модифікації пробіркові рослини мали коротший, але товщий та добре облистлений пагін. Листкові пластинки були більших розмірів та інтенсивно зеленого забарвлення. При оцінюванні розвитку листової пластинки регенованих рослин у балах результати у обох сортів були на користь нової модифікації.

Під час регенерації на середовищі в новій модифікації, порівнюючи з контролем та звичайним середовищем, але на основі картопляного крохмалю, розвиток кореневої системи знижувався. Це пов'язано зі зміною цитокінін-ауксинового індексу, згідно з яким збільшення співвідношення між гормонами цитокінінової і ауксинової природи в сторону цитокінінів вповільнює ризогенез та стимулює бульбоутворення [39, 90].

Таблиця 4.14.

Регенерація і бульбоутворення рослин картоплі залежно від модифікаційних змін живильного середовища Мурасіге і Скуга

Модифікація середовища	Висота рослин, мм*	Розвиток листової пластинки, бал*	Довжина кореневої системи, мм*	Початок столоноутворення, днів	Отримано кондиційних мікробульб
Сорт "Подольянка"					
Базова	178,3	3,7	65,5	44,1	90,0
Нова	137,7	4,1	56,6	10,9	126,7
НІР ₀₅	9,5	0,2	3,3	0,4	9,3
Сорт "Забава"					
Базова	192,0	3,9	79,0	49,6	120,0
Нова	153,5	4,5	59,3	13,4	184,3
НІР ₀₅	7,8	0,1	3,1	0,4	10,1

*Примітка: висота рослини, розвиток листової пластинки та довжина кореневої системи вимірювалися на 15 день культивування.

Незважаючи на нижчий рівень коренеутворення, рослини формували більшу кількість мікробульб. Так, у сорту "Подольянка" за умови культивування на середовищі в новій модифікації, як порівняти з базовою, кількість бульб із 100 рослин зростає з 90,0 шт. до 126,7 шт, тобто на 36,7 шт. У сорту "Забава" зростання кількості мікробульб від використання нового за складом середовища становило 64,3 шт.

Отже, згідно з отриманими експериментальними даними, випробувану модифікацію штучного живильного середовища, на нашу думку, доцільно використовувати для двох процесів клонального мікророзмноження: для отримання мікробульб (збільшується вихід бульб) і для живцювання *in vitro* (живці мають потовщене не витягнуте стебло та добре розвинуті листкові пластинки). Водночас використовувати її для виробництва касетної розсади вважаємо недоцільно, оскільки знижується ризогенез. Тому під час вирощування рослин для постасептичної адаптації в закритому ґрунті (вирощування в касетах і т.п.), в середовищі необхідно зменшувати кількість речовин із цитокініновою активністю.

V. СОМАКЛОНАЛЬНА МІНЛИВІСТЬ *IN VITRO*

Термін “сомаклональна мінливість” [197] вперше було запропоновано для позначення фенотипової мінливості серед рослин-регенерантів, отриманих із культивованих тканин. Однак, із часом він набув ширшого значення і в нинішній час застосовується для позначення будь-яких генетичних або епігенетичних змін в культурі *in vitro* [23].

Генетична стабільність отриманого *in vitro* посадкового (насінного) матеріалу залежить від методу МКРР. Якщо розмноження пов'язане із проліферацією пазушних та верхівкових меристем, їх генетична стабільність зберігається при культивуванні в умовах, що інгібують формування калюсу. У випадку використання середовищ, які стимулюють утворення калюсу, проявляється генетична варіабельність [201].

У процесі розмноження рослин із використанням калюсної культури, завжди існує імовірність одержання форм, неідентичних вихідному генотипу, через її генетичну нестабільності. Сомаклональна мінливість проявляється в клітинах, тканинах та органах рослин: як кількісні, так і якісні мутації, цитологічні порушення, зміни послідовності ДНК, активація та припинення експресії генів [14, 143]. У зв'язку з цим для встановлення їхньої подібності до рослин-донорів необхідне проведення цитогенетичного, ПЛР-аналізу отриманих рослин-регенерантів.

Наприклад, серед сомаклональних варіантів поміж регенерантів *Hosta L.*, отриманих в культурі верхівок пагонів, число змінених форм сягало 43,8% [116]. Більшість таких сомаклонів мали відмінності за площею листя, вмістом хлорофілу та довжиною черешків. Водночас для деяких видів відомі генетично стабільні калюсні культури, що не виключає можливість мікророзмноження на основі індукції морфогенезу у культурі калюсних тканин, наприклад, *Onobrychys, Pallasii* [145]).

З іншого боку, генотипові зміни мають практичне значення в селекції, оскільки є джерелом генетичної різноманітності, і можливості добору цінних варіантів за кількісними та якісними ознаками.

Наприклад, у процесі введення в асептичні умови нами отримано сомаклони хости. Зокрема, клон сорту “Агалон” (рис. 5.1) повільноростучий, з ознаками карликовості, мав короткі черешки, листки менших розмірів, зі світло-жовтим лимонним забарвленням. Кількість листків та пазушних бруньок переважала генетично стабільну форму в 1,5 – 2,0 рази.

У зміненої форми також відзначено вимоги до гормонів. Рослини погано розвивалися на середовищі без ауксинів. Листки ставали білими, із всохлими краями. У випадку додавання в середовище ауксину (ІМК, 2-4 мг/л) розвиток нормалізувався до стану наведеного на рисунку. Натомість такі регенеранти не реагували на додавання цитокініну (БАП) у межах від 0,5 до 3,0 мг/л.

Методом соматичного мутагенезу отримано власний клон, однією із характерних ознак якого є утворення у вузлі трьох листків, а не двох, як у аналогів (рис. 5.2.). Робоча назва 112-3.

Основна вимога для використання МКРР - отримання матеріалу, ідентичного вихідній формі. Лише цей критерій може задовольнити споживачів продукції біотехнологічних лабораторій. Водночас раціональний підхід використання МКРР нівелюється розмноження *in vitro* інфікованого матеріалу, тому першими етапами методу є звільнення матеріалу від різного виду інфекції перед введенням його в асептичні умови. Як відомо, лише апікальна меристема у рослин може бути вільна від вірусів - збудників хвороб, від яких найважче звільнитися в нативних умовах. Величина ж апікальної меристеми дуже мала.

Зміни в геномі при культивуванні *in vitro*, в основному, обумовлені двома причинами. Перша - відмінності соматичних клітин експланта, а друга - вплив компонентів штучного живильного середовища.

Різноманітність на клітинному рівні присутня будь-якому рослинному організму, проте прагнення до його стабільності блокує відхилення, які з'являються. Водночас чим меншу частину організму відділити від нього, тим більша ймовірність прояву клітин з генетичними відмінностями. Крім цього, вважають [1, 86, 139, 150, 156], що мутаційні зміни можуть виникати в результаті порушення корелятивних зв'язків між відокремленою апікальною меристемою та цілісним організмом, дією високої температури в процесі термотерапії, антивірусних речовин за хіміотерапії, нестандартними умовами культивування *in vitro*, наявністю у штучному живильному середовищі біологічно-активних речовин, внутрішніх процесів, пов'язаних із гетеротрофним типом живлення, а також сортові реакції на культивування *in vitro*.

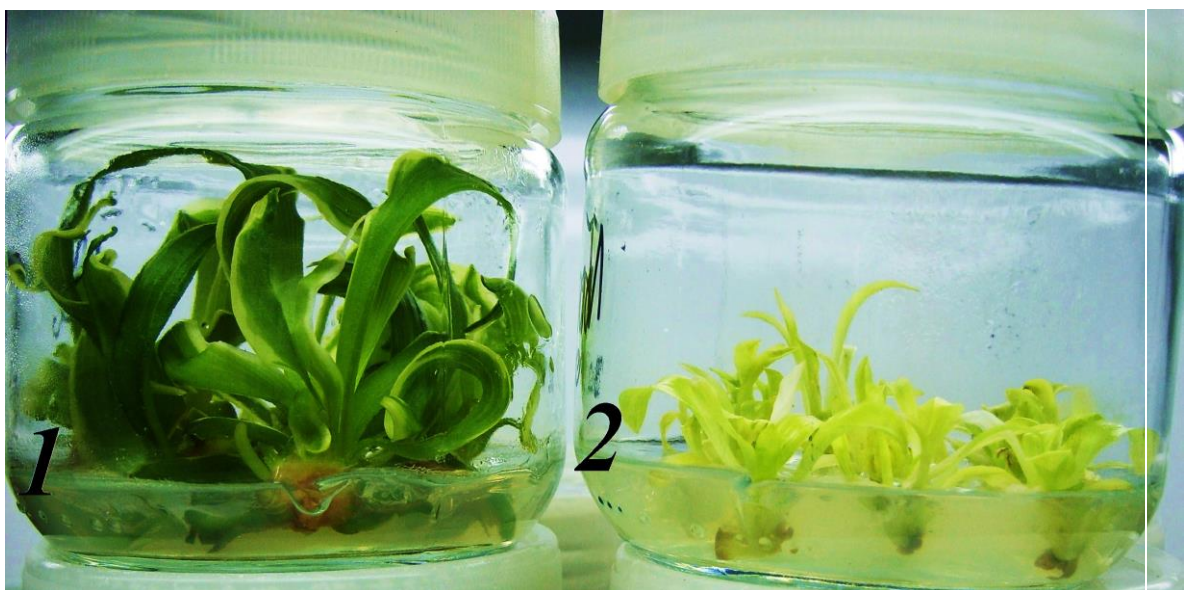


Рис. 5.1. Відмінності соматкльону сорту Агалон, порівняно із вихідною рослиною: 1. Контроль 2. Соматклон Na



Вихідна форма Clone in Vitro 112



Отриманий соматклон 112-3

Рис. 5.2. Мутація в павловнії

Щодо картоплі, генетична різноякісність контролю ознак, яка меншою мірою проявляється *in vitro*, знаходила більше вираження в процесі випробування меристематичних клонів у польових умовах. Виявлене варіювання продуктивності в межах однієї лінії, яке змінювалося в межах 37-60% [139], але за морфологічними ознаками, проходженням фенологічних фаз відмінності не виявлені.

Дослідженнями І. В. Демчук із співавторами [38] були встановлені істотні відмінності меристемних (оздоровлених) ліній різних сортів картоплі від материнських рослин за масою клонів, величиною і кількістю бульб, умістом крохмалю, редуруючих цукрів та сирого протеїну. За елементами структури врожаю відмінності спостерігалися вже в першому бульбовому поколінні. Величина коефіцієнту варіації за продуктивністю серед оздоровлених ліній в межах сортів у 2 рази перевищував величину показника серед клонів материнських рослин.

Виходячи із викладеного, слід погодитися із З. М. Майщук [84], що технологію оздоровлення, зокрема картоплі, слід удосконалювати не стільки в напрямі збільшення обсягу насіннєвого матеріалу, скільки в напрямі підвищення її якості, в тому числі однорідності меристематичних клонів.

VI. ПОСТАСЕПТИЧНА АДАПТАЦІЯ РОСЛИН *IN VITRO*

6.1. Загальні відомості

Адаптація рослин-регенерантів до умов вирощування *ex vitro* є завершальним етапом МКРР. У сучасних дослідженнях із культурою рослинних тканин процес перенесення рослин-регенерантів у природне середовище виділяють як окремий етап морфогенезу [78]. Недосконалість технологічних прийомів на даному етапі суттєво знижує ефективність розмноження *in vitro*. Тому необхідно удосконалювати процес адаптації регенерантів як поодиноких цінних екземплярів, так і за масового промислового великомасштабного виробництва. Проблеми, пов'язані із цілим рядом анатомічних і фізіологічних особливостей регенерованих рослин, яких вони набули *in vitro* формуючи специфічний культуральний фенотип, пов'язані, в першу чергу, із особливостями листків рослин [26, 35].

Культивування рослин в умовах *in vitro* зумовлює зміни в кількості і співвідношенні фітогормонів, ферментів. У свою чергу, це змінює хід метаболічних реакцій і, відповідно, утворення та діяльність органів рослинного організму. *In vitro* при стабільних температурних умовах і вологості повітря рослини формують ніжні невеликі листки, тонкі стебла та слаборозвинену кореневу систему. Такий розвиток листків спричиняється обмеженим культуральною ємкістю життєвим простором та пониженою потребою у фотосинтезі, що пов'язано із частковим гетеротрофним живленням рослин. Водночас *in vitro* присутнє також автотрофне живлення. Поєднання цих двох типів живлення називають міксотрофне живлення. Тобто при культивуванні на штучному живильному середовищі домінує міксотрофне живлення, у якого гетеротрофне відбувається за рахунок екзогенної сахарози, а автотрофне – завдяки процесу фотосинтезу. Однак, культуральні ємності для дотримання стерильності закривають пробками (кришками, фольгою і т.п.), а наявний у них вуглекислий газ швидко використовується. Тому з часом відбувається інгібування автотрофного живлення, а домінує гетеротрофне, яке забезпечується наявністю сахарози в середовищах [139].

Встановлено, що поглинання CO₂ після трансплантації рослин в умови *ex vitro* посилюється тільки в новоутворених листках, тоді як у листках, сформованих рослиною в умовах *in vitro*, інтенсивність процесу майже не змінюється [109].

Відмічалось, що за МКРР регенеранти мають ознаки ювенільності. Ці 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, зумовлено тим, що на початкових фазах онтогенезу світлопоглинаюча система листків ще тільки формується і не має ефективних механізмів протистояння стресам [208]. Необхідно зазначити, що ступінь стійкості пігментів до дефіциту вологи знижується у наступній послідовності: каротиноїди → хлорофіл *b* → 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 їхнього розпаду [208, 223].

У науковій літературі викладені вагомі відомості про хлорофіли як носії адаптивних властивостей фотосинтезувальних структур рослин за несприятливих умов довкілля. Виявлено також закономірну зміну кількості хлорофілу у листках у процесі онтогенезу рослин на різних стадіях розвитку листка та при зміні його довжини [218]. Вважають, що співвідношення ауксини/абсцизини визначає динаміку фотохімічної активності хлоропластів та інтенсивність фотосинтезу в онтогенезі рослини [17].

У хлоропластах функціонує антиоксидантна система, яка пов'язана із фотосинтезом [35]. Активність і направленість процесів, що мають місце в хлоропластах, визначають характер життєдіяльності рослини, їхню реакцію на вплив ряду екологічних факторів [40].

Головна вимога даного періоду – наявність вологи, яка забезпечує певний рівень фізіолого-біохімічних процесів і не призводить до їхнього розбалансування в наземній та підземних частинах, між якими вже склалася певна кореляція. Культуральний фенотип визначається також особливостями кореневої системи. Рослини *in vitro* не мають стимулу формувати добре розвинену кореневу систему. Причиною цього є розміщення коріння у штучних живильних середовищах, забезпечених легкодоступною 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 мікроживці з'являється калус й формуються товсті корені, як правило, між коренями та пагонами з'являється поганий судинний зв'язок. У бокових тканинах, що формуються, відбуваються зміни в провідній системі і гіпертрофія кортикального шару. Нормально утворене коріння регенерується без утворення калусу [35]. Коренева система *in vitro* часто характеризується відсутністю корневих волосків та коренів другого порядку. Через це коріння має невелику площу живлення й слабку поглинальну здатність, що також негативно проявляється на етапі їхньої адаптації до нових умов росту [119].

На фенотип *in vitro* також впливають такі умови: вологість повітря, яка близька до повного насичення, відсутність градієнту водного потенціалу між випарувальною поверхнею листа і атмосферною в ємності де ростуть рослини. Це призводить до інгібування транспірації, яка є рушійною силою верхнього кінцевого двигуна, і, відповідно, системи дальнього транспорту. Останнє спричиняє зниження водоутримуючої здатності листків регенерантів за рахунок відсутності функціонування продихів, погано розвинутої кутикули та зниженого осмотичного потенціалу. Таким чином, звання до специфічного комплексу факторів *in vitro* викликає адекватні пристосувальні реакції рослин. Але, в звичайних умовах, після пересадки регенерантів *ex vitro* такі пристосування виявляються згубними для рослин тому, що відбувається незворотне зневоднення рослин-регенерантів [133].

Особливості переходу рослин з *in vitro* в *in vivo*. У процесі розмноження рослини *in vitro* необхідно підготувати її до переходу на автотрофне живлення за умови пересадки в субстрат. Для цього їх, як правило, розміщують на середовищах із зменшеним вмістом вуглеводів, мінеральних елементів та додають ауксини, необхідні для індукції коренеутворення. Цей перехід з асептичних умов в *in vivo* без проміжної адаптації часто супроводжується в'яненням та загибеллю рослин, непристосованих до умов відкритого ґрунту. Так, зокрема пересадка рослин зі стерильних стабільних умов в нестійкі умови *in vivo* спричинює серйозні проблеми з водним обміном рослин. Це пов'язано з морфологічними змінами в рослин *in vitro*: мала кількість кутикулярного воску та слабкорозвинута хлоренхіма, слабка автотрофна активність, зміни в роботі продишного апарату, що призводить до збільшення втрат води [169].

Також відбуваються зміни в гормональному статусі регенерантів. Якщо в ювенільних рослин переважають ауксини й цитокиніни над абсцизинами, то за умов перенесення рослин у несприятливі умови *in vivo* зростає кількість останніх [148, 224]. Ворінг П. [223] вважає, що абсцизова кислота необхідна для підтримання оптимального водного балансу і попередження надлишкових втрат води.

Доведено, що накопичення значної кількості абсцизової кислоти за умов водного стресу корелює з розвитком посухостійкості та залежить від сортових особливостей картоплі. Так, в листках картоплі сорту “Темп” у фазу цвітіння за умов посухи відбувалось зміщення фітогормонального балансу в бік переважання синтезу АБК, порівнюючи з ІОК, зеатином і зеатинрибозидом. Встановлено, що посуха індукувала зростання кількості глутаміну і, особливо, аспарагіну в листках і бульбах картоплі. Крім цього, слабостійкі до посухи сорти містили більшу кількість амідів, ніж стійкі. Обробка рослин регуляторами росту індукувала зменшення кількості амідів у листках картоплі [218].

Поступове зневоднення пагона зумовлює зростання рівня АБК в корінні [132, 208]. Окрім впливу на продиши, відома стимулююча дія цього гормону на водну провідність коренів [48]. Накопичення АБК часто співпадає зі зменшенням вмісту цитокинінів, а як відомо, ці гормони є антагоністами в процесах регуляції інтенсивності транспірації [8, 49].

Адаптацію до нестерильних факторонестатичних умов найчастіше проводять у спорудах штучного клімату (кліматокантери, фітотрони, гідро- та аеропонні установки), що дозволяє створювати навколо рослини *ex vitro* певний мікроклімат. Поступово впродовж 30–50 днів 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 збільшити внесення фосфору, а при другому – азоту, щоб стимулювати розвиток асиміляційної поверхні пагона [50].

Під час адаптації, крім параметрів мікроклімату, надзвичайно важливим є субстрат, у який висаджується рослина після штучного живильного середовища. Основні вимоги до них такі: вміщувати в собі одночасно велику кількість доступної вологи та повітря; довговічність; безпечність для навколишнього середовища та у приготуванні; придатність для стерилізації; не засолюватися і легко промиватися від надлишку солей; дешевизна і низькі затрати на експлуатацію.

Субстрат діє на рослину як прямо, так і опосередковано більшою мірою через режим живлення. Різні його водно-фізичні властивості зумовлюють неоднакове поглинання мінеральних речовин, а це означає, що для кожного субстрату необхідно підбирати свої режими мінерального живлення.

Види субстратів. У світі відомо більше 20 субстратів для вирощування рослин. Часто також використовують їхні суміші [8]. На практиці 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.

Торфом називають органічну породу, що складається із залишків болотних рослин і продуктів їхнього неповного розпаду. За комплексом показників найкращим вважається сфагнумів торф. Як субстрат можна використовувати сфагнумів мох (*Sphagnum*). Рід *Sphagnum* включає 320 видів. Це переважно болотні мохи, що ростуть густими щільними скупченнями, утворюючи крупні подушки або суцільні килими на сфагнумових болотах. Рідше сфагнум зустрічається у вологих лісах. Прямостояче м'яке стебло висотою 10–20 см із пучкоподібно розміщеними гілочками. Листки сфагнуму містять велику кількість мертвих водонесних клітин із порами, які легко поглинають воду, що зумовлює їхню високу вологоємність. Сфагнум не містить поживних речовин, має кислу реакцію (рН~3). Здатність цього моху поглинати і утримувати воду (деякі види поглинають вологу в 20 разів більше власної ваги) дозволяє забезпечити необхідну вологість субстрату [95].

Подрібнений сфагнум використовують як компонент земляного субстрату і для укриття ґрунту. Це дозволяє тримати стабільною вологість навколо рослин. Також мох поглинає в себе надлишки солей і легко може бути замінений на свіжий у міру засолення. Суміші, що містять сфагнум, мають високу повітряно- та вологопроникність. Субстрат зволожується рівномірно, не утворюючи застою води, і довго залишається пухким і легким. Добре підходить для утворення коренів у молодих рослин.

Відомі бактерицидні властивості сфагнуму [50]. Завдяки сфагнолу, особливій протигнільній речовині, сфагнум перешкоджає загниванню кореневої системи рослин і розвитку хвороботворних мікробів у ґрунті й на поверхні. Стерилізують мох, заливаючи його кип'ятком на 3-5 хв., потім відціджують.

Мінеральні субстрати. Використовуються або самі мінерали (щебінь, цеоліт), або продукти їхньої переробки (мінеральна вата, керамзит, вермикуліт, перліт). Усім цим матеріалам притаманні довговічність, висока інертність, пористість, невисока вологоємність [167].

Мінеральну вату, перліт, вермикуліт, керамзит отримують під час обробки гірських мінералів високою температурою (більше 1000 °С). Це дозволяє знищити всю патогенну мікрофлору. Субстрат після охолодження запаюють у герметичну плівкову тару. У такому стані він може тривалий час зберігати стерильність, навіть, під час транспортування. Нагріваючись, мінерал розширюється, збільшується в розмірах, його внутрішня структура руйнується. Після остигнення він стає легким та пористим.

В Україні як мінеральний субстрат широко застосовують перліт. Отримують його в результаті термообробки (1000–1200 °С) вулканічного піску із родовищ в Закарпатті. Має високі сорбційні властивості, тривалий час зберігає стерильність, пористість, вологоємність. Одним із недоліків перліту є утворення під час вантажно-розвантажувальних робіт білого пилу та крихкості.

Перенесення рослин з умов *in vitro* в умови *in vivo* – важливий і найбільш трудомісткий заключний етап МКРР. 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. При цьому рослина швидше стає автотрофною, здатна до самостійного існування і придатна для пересаджування в природні умови.

Важливим аспектом роботи є вибір ґрунтового середовища, в яке переноситься рослина. Переважно це суміш торфу з піском, перлітом або вермикулітом. Наприклад, для суниці, вишні, смородини використовують суміш – ґрунт : торф : пісок = 1:1:1 [56, 95]. Перед висаджуванням у ґрунт корені рослин промивають у розчині фунгіциду (фундазол, бенлат та інші). Висаджують рослини не дуже загущено, щоб запобігти розвитку грибних захворювань і видовженню пагонів у конкуренції за світло. У період вирощування щотижня рослини обприскують слабким розчином фунгіциду.

Фізіологічні особливості молодих листків (відсутність захисного воскового шару), а також кореневої системи (недостатньо закріплена у ґрунті, відсутність потужної зони корневих 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 *in vitro*, – найважливіший фактор перших тижнів їхнього вирощування. Для цього використовують установки туманоутворення в теплицях, покривання рослин поліетеленовою плівкою, нетканим волоком або скляним посудом. Таким чином, створюються умови вологої камери. Як правило, високий рівень вологості підтримують до утворення нового листка впродовж двох і більше тижнів (рис. 6.1).



in vitro (агаризоване середовище)

ex vitro (субстрат на основі перліту)

Рис. 6.1. Зміни рослин гортензії (*Hydrangea macrophylla*) за постсептичної адаптації впродовж 15 днів

Потім рослини загартовують – готують до відкритого ґрунту: поступово знімають покриття з них і зменшують вологість до природної. Для загартування рослин в останній фазі адаптації необхідно приділяти увагу оптимальному живленню рослин. Надлишкове підживлення призводить до жирування рослин: вони стають надмірно рослими, крихкими і погано приживаються після перенесення у відкритий ґрунт.

Якщо робота проводиться у великих промислових масштабах, то період адаптації рослин бажано спланувати і проводити з березня до вересня, що скоротить до мінімуму витрати. Рослини, одержані у зимовий період, зберігають у холоді (+5°...+8 С°) при додатковому освітленні, а весною проводять усі названі вище операції із перенесення в умови природного існування.

6.2. Особливості регенерації рослин картоплі *ex vitro* з живців залежно від субстрату та площі живлення

Технології оздоровлення та МКР картоплі розроблені ще у 80-х роках минулого століття. Однак і на сьогодні залишається актуальним питання прискореного розмноження в умовах *ex vitro* дешевого і адаптованого до звичайних умов безвірусного садивного матеріалу [51].

В умовах закритого ґрунту для вирощування картоплі застосовують понад 20 субстратів та їхніх комбінацій. Кожен з них має як недоліки, так і переваги. Зокрема, застосування звичайного ґрунту та торфу призводить до розвитку сапрофітних грибів, які часто можуть мацерувати тканини живців. Пісок та гранітний пил, маючи низьку вологоємність, швидше втрачають воду, а отже, існує ризик зневоднення живців, які не мають достатньо розвинутої кореневої системи. Також ці субстрати є дуже важкими, що зумовлює труднощі з їх транспортуванням та часто призводить до псування тепличних касет або інших ємностей. Недоліком перліту є його крихкість та утворення пилу у роботі з ним. Новими і перспективними є синтетичні субстрати гідрогелі (гідрогель, аквасорб) [51]. Тому нами порівняно ефективність застосування субстратів із урахуванням їхньої вартості, маси, впливу на онтогенез і продуктивність регенерантів та підбору оптимальної площі живлення. Дослідження проводили на базі міжкафедральної лабораторії Білоцерківського НАУ “Біотехнологія рослин” у два етапи:

Перший етап – порівняння субстратів для постасептичного живцювання: 1) ґрунт (чорнозем); 2) верховий торф; 3) мох сфагнум; 4) пісок; 5) гранітний пил; 6) перліт; 7) гідрогель crystal soil; 8) гідрогель crystal water; 9) пластагар.

Другий етап – визначення оптимальної площі живлення для регенерантів за таких схем посадки на перлітовий субстрат: 1) 2,5×2,5 см; 2) 5×5 см; 3) 7×7 см; 4) 10×10 см; 5) 12×12 см.

Одним із основних технологічних показників розсади є приживлюваність регенерантів та прояв у них ознак, які є цінними для успішної висадки розсади у поле або теплицю. Найбільша приживлюваність відмічена при висадці живців на такі субстрати: мох сфагнум – 93,1 %; перліт – 96,9 %; обидва види гідрогелю – 92 і 97 % та мінеральна вата – 92, 0 % (табл. 6.1).

Кількість листків (кількість міжвузлів) є також важливою умовою успішної постасептичної адаптації регенерантів. Адже чим краще розвинений асиміляційний апарат, тим більше поступатиме поживних речовин для будови нових органів, енергії на транспорт поживних речовин та протидію стресовим факторам.

Візуально листки регенерантів відрізнялися за інтенсивністю забарвлення. Найбільш інтенсивне зелене забарвлення та великі за розмірами листові пластинки виявлені в рослин *ex vitro*, які вирости на мінеральній ваті та перліті. Дещо дрібніші листки відмічені в регенерантів, які росли на моху сфагнумі.

Відомо, що ефективність постасептичної адаптації значною мірою залежить від показників ризогенезу регенерантів. Встановлено, що найбільша кількість коренів відзначена в регенерантів, вирощених на таких субстратах: мох сфагнум – 6,7 шт.; перліт – 6,1 шт.; мінеральна вата – 6,0 шт. Найдовші корені були у рослин, що вирости на перліті – 13,7 мм та мінеральній ваті – 11,4 мм.

Окрім розсади перспективним для потреб первинного насінництва є отримання мінібульб, тому нами проаналізовано ефективність використання різних субстратів для виробництва такого садивного матеріалу (табл. 6.2). Найшвидше столоноутворення наставало на гідрогелях – 21 і 23 дні. Дещо повільніше на пластагарі – 31 день. Найдовший в досліді період від висадки живців до утворення регенерантами стolonів був у варіантів із використанням ґрунту – 43 дні, перліту – 44 дні, мінеральної вати – 40 днів.

Таблиця 6.1.

Стан регенерантів картоплі залежно від субстратів на 20 день культивування, сорт “Подольанка”

Субстрат	Прижилось живців, %	Висота рослин, мм	Кількість міжвузлів, шт.	Кількість коренів, шт.	Довжина кореневої системи, мм	Кількість міжвузлів, шт.
ґрунт	67,3	127,7	7,9	2,7	7,8	4,7
торф	46,2	108,4	7,3	3,9	6,3	4,3
мох сфагнум	93,1	114,6	8,1	6,7	7,3	5,1
пісок	78,6	98,5	7,1	4,2	9,4	5,6
гранітний пил	74,4	129,8	8,0	3,7	4,2	4,8
перліт	96,9	149,0	9,4	6,1	13,7	6,5
гідрогель crystal soil	92,4	87,8	6,1	2,1	3,3	4,0
гідрогель crystal water	96,2	124,2	6,7	2,7	4,6	4,2
Пластагар	89,7	98,6	7,4	4,8	3,2	4,3
мінеральна вата	92,0	117,6	7,5	6,0	11,4	6,3
НІР 05	2,6	7,0	0,4	0,3	0,5	0,4

Період від живцювання до початку утворення регенерантами мінібульб залежав від субстратів аналогічно періоду столоноутворення. Найшвидше бульбоутворення розпочиналося на гідрогелях – 34 і 27 днів. Найдовший період культивування (час від висадки живців до відмирання бадилля) був на перліті – 92 дні, що на 20 і 23 дні більше, ніж у варіантах із гідрогелями. Тривалість періоду між живцюванням і відмиранням регенерантів є важливим технологічним показником при вирощуванні касетної розсади, оскільки подовжується період, що дозволяє висаджувати розсаду у поле чи теплицю або ж отримання мінібульб.

Найбільшу кількість мінібульб і найбільшу їхню масу з однієї рослини зібрано на верховому торфі – 2,2 шт. при масі бульб 1,3 г; на перліті 2,6 шт. і 1,6 г та мінеральній ваті – 2,3 шт. загальною масою 1,3 г (табл. 6.2).

Отже, за регенерацією пагона, ризогенезом та утворенням мінібульб кращим субстратом для постасептичної адаптації рослин картоплі є перліт.

Однією з причин пошуку оптимальних площ живлення при постасептичній адаптації рослин картоплі *ex vitro* є отримання більшої кількості якісного матеріалу за якомога менших затрат електроенергії. Тому нами після визначення кращого субстрату було досліджено вплив площі живлення на перебіг процесів, які проходять під час переходу рослин з асептичних у нативні умови, зокрема і столоно- та бульбоутворення при використанні цього субстрату.

Серед порівнюваних площа живлення найменша 6,25 см² була при розмірах комірки 2,5×2,5 см, а найбільша 144 см² – при 12×12 см. Площа живлення, а отже, і густота розміщення рослин також впливали на прояв біометричних показників. (табл. 6.3). За умови найменшої площі живлення в касетах рослини мали найменшу висоту – 398 мм і найменшу у досліді кількість міжвузлів у пагоні – 4,3 шт. У протилежному варіанті висота рослин була 876 мм, і вони мали 6,3 міжвузлів на пагоні.

Площа живлення впливала також на особливості ризогенезу. Рослини при площі живлення 6,25 см² (2,5×2,5 см) мали довжину кореневої системи 49 мм та 3,6 шт. коренів. Підвищення площі живлення до 100,0 см² (10×10 см) супроводжувалося збільшенням кількості коренів до 7,1 шт. на рослину та довжини кореневої системи 179 мм. Найрозвинутішими були корені при вирощуванні рослин із площею живлення 144,0 см² (12×12 см). Середня кількість коренів була 8,3 шт., а довжина кореневої системи – 203 мм.

Таблиця 6.2

Столоно- та бульбоутворення в регенерантів картоплі залежно від субстратів, сорт “Подольнка”

Субстрат	Термін в днях від висадки живців			Утворилося бульб на рослині	
	до утворення столонів	до утворення бульб	до відмирання надземної частини	шт.	г.
грунт	43	56	87	1,6	0,7
торф	38	51	84	2,2	1,3
мох сфагнум	40	54	85	1,9	1,1
пісок	34	50	81	1,7	0,8
гранітний пил	36	53	83	2,0	0,9
перліт	44	60	92	2,6	1,6
гідрогель crystal soil	21	27	67	1,7	0,9
гідрогель crystal water	23	34	72	1,9	1,0
пластагар	35	48	82	1,6	0,7
мінеральна вата	40	49	79	2,3	1,4
НІР ₀₅	3	4	4	0,3	0,1

Площа живлення є одним з факторів, що впливає на швидкість розвитку. Обмеження життєвого простору прискорює розвиток і вповільнює ріст [19]. За нашими даними, найменша площа живлення зумовила початок розвитку столонів у рослин на 31-й день, а бульб – на 43-й день. Рослини при найбільшій в досліді площі живлення – 144 см² утворювали столони на 40 день культивування, а бульби на – 63 день (табл. 6.4).

Таблиця 6.3.

Вплив площі живлення на розвиток пагонів картоплі при постасептичному живцюванні, сорт “Подолька”

Розміри комірки	Площа живлення, см ²	Висота рослин, мм	Кількість міжвузлів, шт.	Кількість коренів, шт.	Довжина кореневої системи, мм
2,5×2,5 см	6,25	398	4,3	3,6	49
5×5 см	25,0	463	4,9	4,7	95
7×7 см	49,0	509	5,2	5,4	143
8×8 см	64,0	563	5,6	6,7	176
10×10 см	100,0	692	6,0	7,1	179
11×11 см	121,0	729	6,2	7,9	201
12×12 см	144,0	876	6,3	8,3	203
НІР ₀₅	7,2	12,3	0,2	0,2	12

Таблиця 6.4.

Вплив площі живлення на столоно- та бульбоутворення картоплі при постасептичному живцюванні, сорт “Подолька”

Розміри комірки	Початок утворення, на добу		Кількість мінібульб на одній рослині, шт.	Маса мінібульб з однієї рослини, г.
	столонів	бульб		
2,5×2,5 см	31	43	1,1	0,8
5×5 см	34	50	2,6	1,6
7×7 см	37	59	2,9	1,8
8×8 см	38	61	3,1	2,0
10×10 см	38	63	3,3	2,7
11×11 см	40	63	3,3	2,8
12×12 см	40	63	3,4	3,0
НІР ₀₅	3	4	0,2	0,3

Різні площі живлення зумовлювали неоднаковий ріст та розвиток регенерантів, що вплинуло на утворення мінібульб. Збільшення життєвого простору підвищувало як їхню кількість, так і масу (рис. 6.2).

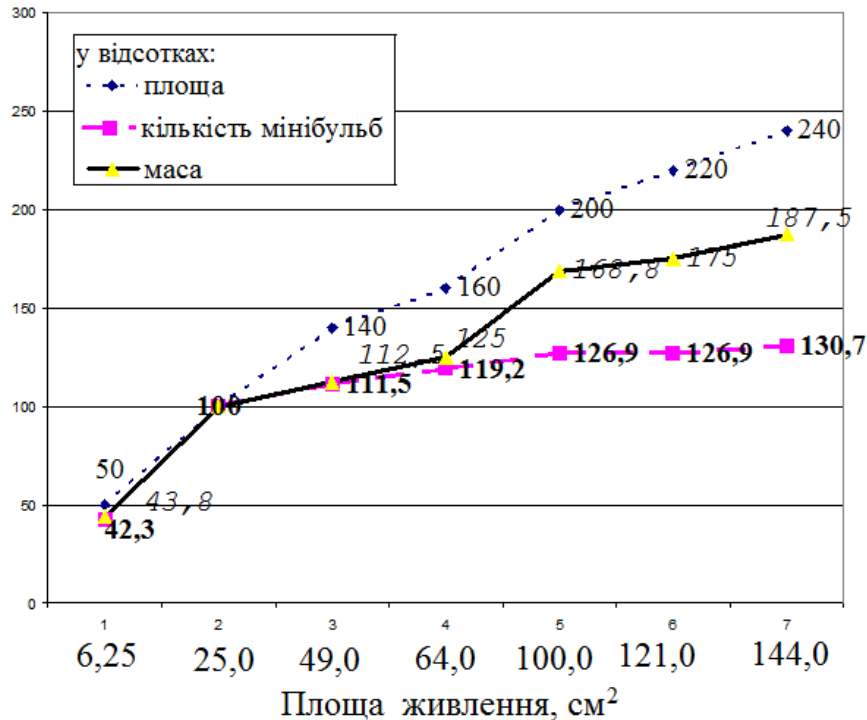


Рис. 6.2. Площа живлення, кількість і маса мінібульб з однієї рослини-регенеранта, сорт “Подолька”

Збільшення площі живлення з 25 см² (100%) до 49 см² (140%) зумовило зростання на 12,5% маси і на 15,5% кількості мінібульб. При подвоєнні площі живлення (200%) їхня кількість зросла на 26,9%, а маса мінібульб з одної рослини на 68,8%. Тобто збільшення площі живлення у два рази не спричиняло зростання маси і кількості бульб вдвічі.

Отже, серед порівнюваних субстратів для висадки живців *in vitro* в умовах *ex vitro* найбільший вихід регенерантів (96,9%) отримано при застосуванні перліту. Збільшення площі живлення до 25 см², зростання кількості і маси бульб відбувається пропорційно. За умови подальшого зростання площі живлення, інші згадані показники характеризувалися відносно нижчим проявом, а тому, з економічної точки зору оптимальна площа живлення для отримання міні бульб становить 25 см².

6.3. Вплив субстрату на постсептичну адаптацію регенерантів *in vitro* *Thuja occidentalis* Smaragd

Отримані результати дослідження є продовженням розробки МКР туї західної. Вивчали вплив субстратів на адаптацію пробіркових рослин до умов відкритого ґрунту. Випробовано такі субстрати (табл. 6.5, рис. 6.3): 1. перліт (контроль), 2. мох сфагнум, 3. гідрогель crystal water, 4. гідрогель crystal soil, 5. пластагар.

Виявили неоднаковий розвиток регенерантів у постсептичних умовах. Виділився варіант із використання блакитного гідрогелю *crystal water*. За умови його застосування в регенерантів інтенсивно утворювались нові та бічні корені. Вони мали світло-коричневий колір. Деяко поступалося цьому варіантові застосування моху сфагнуму (рис. 6.4). Зокрема, регенеранти мали, порівнюючи з гідрогелем, коротші корені й світлозелену хвою. Типовим природним кольором були забарвлені луски регенерантів, отриманих на перліті.

Вплив субстрату на постасептичну адаптацію регенерантів *in vitro* *Thuja occidentalis* форма *Smaragd*

Субстрат	Приріст, мм		Кількість новоутворених бічних коренів, шт.	Колір лусок хвої
	пагону	кореня		
Перліт (контроль)	6,4±0,4	4±0,3	2±0,2	Зелено-антоціанові
Мох сфагнум	18±0,7	16±0,8	8±0,5	Світло-зелені
Гідрогель <i>crystal soil</i>	31±0,8	28±0,9	14±0,7	Природні темно-зелені
Гідрогель <i>crystal water</i>	3±0,3	1±0,2	1±0,2	Антоціаново-зелені
Пластагар	3±0,4	1±0,3	1±0,2	Антоціаново-зелені



Рис. 6.3. Постасептичний розвиток регенерантів залежно від субстрату: 1. Перліт (контроль). 2. Мох сфагнум. 3. Гідрогель *crystal water*. 4. Гідрогель *crystal soil* 5. Пластагар

Регенеранти на інших варіантах мали менші прирости коренів та пагона і відхилення від природного забарвлення лусок хвої.

Однак, на перліті утворювалося в середньому лише 2 бічних корені, тоді як використання моху дозволяло отримати 8 коренів, а на блакитному гідрогелі – 14 шт.

Регенеранти, отримані на зеленому гідрогелі (*crystal soil*) та пластагарі, мали ледь помітні прирости пагона та коренів.



Рис. 6.4. Розвиток регенерантів на перліті (1) сфагнумі (2)

6.4. Введення регенерантів *in vitro* у стан спокою як шлях постасептичної адаптації

МКРР дозволяє прискорено розмножувати рослини майже усіх видів із коефіцієнтом у рік 1:1000 і більше [56, 78, 95]. Отриманий біотехнологічний матеріал після *in vitro* висаджують в природні умови або закритий ґрунт у вигляді розсади. Цей метод зручний і простий у застосуванні. Однак, окрім переваг, йому властиві ряд недоліків. А саме: неможливо проводити поступове (впродовж року) накопичення матеріалу, сезонність та наявність пікових біологічних періодів, значні затрати на підтримання мікроклімату, значне травмування рослин під час транспортування. Після висаджування в ґрунт розсаді необхідний певний період для приживлення та акліматизації до умов *in vivo*. В цей час втрати рослин-регенерантів можуть становити 50-100% [51, 210, 219].

Пов'язано це з тим, що умови, які складаються при асептичному автотрофному культивуванні, а саме: водний потенціал поживних середовищ, що в десять разів нижчий ґрунтового, висока вологість *in vitro*, інтенсивність транспірації, що близька до нуля [166], призводять до втрати продирами здатності закриватися [169]. При різкому переміщенні рослин *in vitro* у природні умови інтенсивність транспірація сягають високого рівня. І це може бути причиною втрат 100% розсади [24]. Тобто проблема реадптації регенерантів до природних умов залишається актуальною.

Водночас у природі відомі механізми входження рослин у стан спокою, що дозволяє їм подолати несприятливі умови і почати життєвий цикл рослини з початку у вигляді нового організму – насінини чи органу вегетативного розмноження. Проростання насінини або бульби розпочинається з першого етапу органогенезу, і впродовж життєвого циклу в рослин йде адаптація до умов навколишнього середовища. Згідно з твердженнями Ф.М. Куперман [74], умови визначають особливості формування органів і тканин організму, в яких у свою чергу, закладаються пристосування до них. Пошук методів використання спокою рослин-регенерантів, які б дозволили покращити постасептичну адаптацію, поставлено за мету наступного дослідження.

Використовували для культивування *in vitro* два систематично віддалених види рослин: картопля (сорти “Подолька”, “Червона рута”) та хоста (сорти “Патріот”, “Паульс Глорі”). Живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга, вибірка 30 рослин. Постасептичне вирощування проводили на перлітовому субстраті в умовах вологої камери.

Для отримання матеріалу, який вводився в спокій, необхідно забезпечити не тільки різні умови культивування живців, але й неоднакові час, затрати електроенергії та витратних матеріалів. Одним з критеріїв для порівняння варіантів була величина коефіцієнту розмноження.

Наприклад, з однієї пробіркової рослини картоплі через місяць можна отримати 5-7 регенованих рослин, за два місяці – 30-40 рослин, за три – 150-200, за чотири – 450 –550 рослин, а за 10 місяців – більше як 0,5 мільйона рослин. У випадку отримання мікробульб, цей показник буде приблизно в 4-5 разів менший тому, що вихід бульб *in vitro* на одну рослину становить 1,3 - 2,1 шт. залежно від сорту [90]. За умов майже відсутньої сезонності у виробництві коефіцієнт розмноження рослин *in vitro* корелює із періодом культивування регенеранту (рис. 6.5).

Затрати часу на вирощування однієї рослини *in vitro* (розсади), як порівняти з мікробульбами, були меншими і, залежно від досліджуваних сортів, становили: у сорту “Подолька” – 23 дні, а “Червона рута” – 34 дні. Значно довший період необхідний був для отримання мікробульб. У сорту “Подолька” це становило 82 дні, а “Червоної руги” – 104.

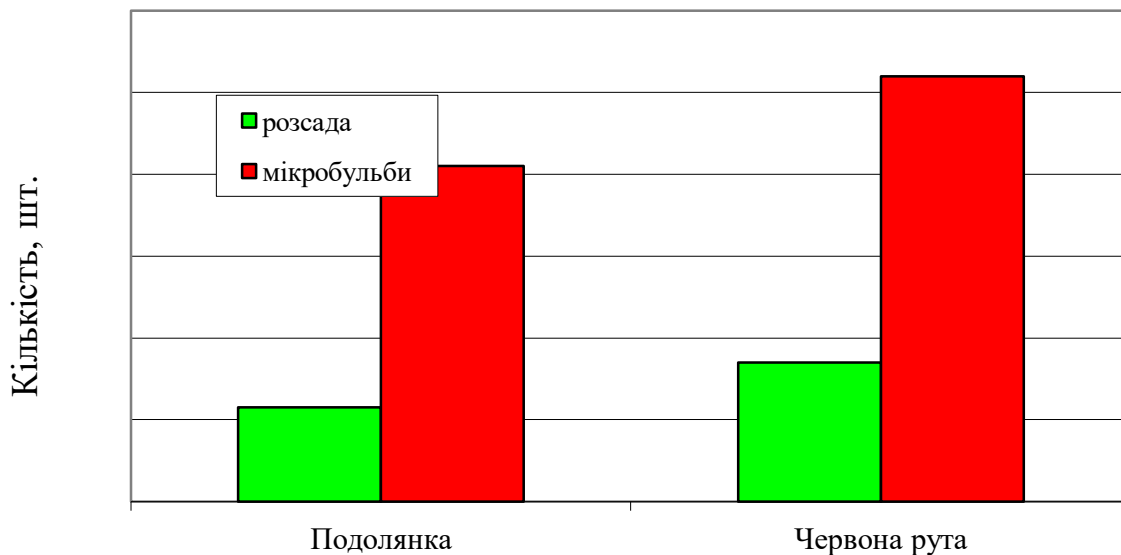


Рис. 6.5. Тривалість періоду культивування регенерантів залежно від методу прискороного розмноження, дні

При висаджуванні в закритому ґрунті розсади та мікробульб виявлено відмінності в рості рослин картоплі (табл. 6.6). Розсаду висаджували в закритий ґрунт вже зі сформованою (певною мірою) надземною частиною, а для мікробульб необхідно було 18 днів для появи перших сходів. У висаджених регенерантів встановлено різну кількість головних стебел у кущі та неоднакову глибину закладання столонів. Насадженням, сформованим із розсади, властиве одне стебло й неглибоке закладання столонів (1,5 см), а кущі картоплі, що виростили з мікробульб, мали два і більше пагонів.

Розсада обох сортів, порівнюючи з мікробульбами, мала коротший період вегетації. На нашу думку, це може бути зумовлено двома чинниками: вповільненням росту та прискоренням розвитку рослин внаслідок складної постасептичної реадaptaції після культури *in vitro*; те, що пробіркові рослини висаджуються (розпочинають період вегетації) в закритому ґрунті вже з сформованим стеблом.

Менша кількість столонів у насінневого матеріалу із розсади також пов'язана із можливими постасептичними пристосуваннями рослин. Так, розсаді необхідний певний період для приживання, під час якого знижується тургор, що є сильним стресовим фактором [90, 102].

Як відомо, стрес стримує ріст і відповідно гальмується утворення більшої кількості вегетативних органів та скорочується період вегетації. Це, зі свого боку, позначається на продуктивності рослин. У нашому досліді у обох сортів картоплі в закритому ґрунті утворилося більше мінібульб з рослин, що виростили з мікробульб. Отже, введення картоплі *in vitro* в спокій (утворення мікробульб) покращує постасептичну адаптацію.

Таблиця 6.6.

Особливості онтогенезу різного за походженням вихідного насіннєвого матеріалу картоплі в умовах закритого ґрунту.

Тип вихідного насіннєвого матеріалу	Кількість, шт.		Глибина закладання столонів, см	Період вегетації, днів	Утворилося мінібульб, г
	пагонів	столонів			
Сорт "Подольянка"					
розсада	1,1	2,1	1,5	78	1,68
мікробульби	2,3	4,3	5,7	94	2,74
НІР ₀₅	0,1	0,3	0,2	3	0,08
Сорт "Червона рута"					
розсада	1,3	2,8	2,3	104	1,93
мікробульби	2,9	5,3	6,3	122	3,06
НІР ₀₅	0,1	0,2	0,3	5	0,10



Рис. 6.6. Морфогенез *in vitro* розсади хости залежно від умов культивування 1 – рослини без коренів (надлишок цитокинів в середовищі); 2 – рослини з коренями (надлишок ауксинів).



Рис. 6.7. Введення рослин хости *in vitro* в стан спокою: 1 – до спокою; 2 – після стану спокою: а без видалення відмерлих листків; в – після видалення відмерлих листків

Іншим ботанічним видом, на якому досліджували вплив введення рослин *in vitro* в стан спокою, були регенеранти двох сортів хости. Порівнюючи два види розсади (рис. 6.6): з коренями та без них, а також рослини, що були введені в стан спокою (рис. 6.7), виявили відмінності *in vitro* в постасептичному розвитку. Розсада, як рослини із кореневою системою, так і без неї, відрізнялася, при асептичному культивування (табл. 6.7).

Таблиця 6.7.

Вплив введення регенерантів *in vitro* в стан спокою на постасептичний онтогенез розсади хости на 60 день

Варіант розсади		Прижилось, %	Кількість коренів, шт.	Кількість пагонів, шт.	Маса рослин, г
Сорт "Патріот"					
Не була в спокої	без кореня	43,6	5,3	1,9	0,5
	з коренем	59,4	7,4	1,2	0,9
Пройшла стан спокою		91,6	6,9	6,1	3,6
НІР ₀₅		4,1	0,3	0,3	0,4
Сорт "Паульс Глорі"					
Не була в спокої	без кореня	37,8	6,2	1,7	0,6
	з коренем	56,6	8,1	1,4	1,2
Пройшла стан спокою		87,2	7,6	5,2	3,9
НІР ₀₅		5,3	0,4	0,3	0,5

За умови вирощування рослин без коренів на штучних живильних середовищах, збагачених цитокинінами (БАП, 2,5 мг/л), утворювалися рослини із 2-3 пагонами та великими листками, однак, ризогенез був майже відсутній. Лише в поодиноких рослин формувалося 1-2 корені довжиною 5-10 мм. Розсада, що вирощувалася на середовищах, збагачених ауксинами (ІМК, 4 мг/л), навпаки, мала інтенсивно розвинену кореневу систему, але поступалася згаданому вище варіанту за розвитком асиміляційного апарату.

Морфологічні особливості, які були задані ще в асептичних умовах, проявлялися і *ex vitro*. Тобто, розсада із сформованою *in vitro* кореневою системою, мала і в закритому ґрунті найбільшу кількість коренів: 7,4 шт. у рослин сорту "Патріот" та 8,1 шт. у сорту "Паульс Глорі".

Найбільша кількість рослин, які прижилися як *in vitro*, так і *ex vitro*, була у варіанті, де вони пройшли стан спокою. За 60 днів культивування у цьому варіанті сформувалася найбільша кількість пагонів, маса рослин, хоча в перші дні росту у них були лише невеликі та згорнуті пластинки. Проте, рослини обох сортів цього варіанту за розмірами і масою переважали інші варіанти в декілька разів. Зокрема рослини, вирощені з матеріалу, що не пройшов стан спокою, мали в сорту "Патріот" масу 0,5 (розсада без кореня) і 0,9 (розсада з коренем) грам проти 3,6 грам у рослин, що пройшли стан спокою.

Поряд із морфогенезом пагонів та коренів головним показником постасептичної адаптації є приживлення рослин. Якщо в картоплі між розсадою і мікробульбами не відмічалось чіткої різниці в приживленні асептичного матеріалу, а була різниця за розвитком, то в хости показник приживлення рослин *in vitro* дуже відрізнявся за варіантами. Зокрема, в сорту “Паульс Глорі” з розсади без кореня прижилося 37,8% рослин, а розсади із коренем становили 56,6%. Найбільший відсоток приживання становив у варіанті з рослинами, які пройшли стан спокою – 87,2. Подібна закономірність встановлена і в сорту “Патріот”.

Таким чином, у дослідах з рослинами картоплі та хости встановлено, що введення *in vitro* регенерантів в спокій покращує їхнє постасептичне культивування, тобто за таких умов краще відбувається адаптація.

Отримані результати були підтверджені на рослинах *ex vitro* малини (сорти “Брусвяна”, “Octavia”, “Maravilla”, температура +2-+4⁰C), лохини (сорти “Patriot”, “Bluescor”, температура +6-+8⁰C), фундука (сорт Барселонський, +4-+6⁰C), . Пагони рослин дерев’яніли, бруньки збільшувалися в розмірах та вкривалися захисними криючими лусками, листя старіло й опадало. За підвищення температури відмічалось пробудження бруньок та спостерігався вирівняний ріст рослин після стану спокою.

6.5. Трофічна та гормональна детермінація ризогенезу *in vitro* регенерантами хости

Біотехнологічні методи розмноження будь-якої культури є ефективними за умови успішної постасептичної адаптації регенерантів. Саме індукція та утворення ризосфери експлантами поряд із регуляцією водообміну є найважливішими складовими такої адаптації. Нами вивчено детермінанти ризогенезу хости *in vitro*.

Під час культивування на середовищах із невисоким умістом ауксинів та цитокінінів (БАП – 0,75 мг/л, ІМК – 0,75 мг/л) встановлено індукуючий вплив умов вирощування рослин-донорів на коренеутворення регенерантів (табл. 6.8, рис. 6.8).

Таблиця 6.8.

Вплив довжини фотоперіоду культивування рослин-донорів експлантів на ризогенез у регенерантів хости

Довжина фотоперіоду, годин	Початок коренеутворення, днів		Розвиток кореневої системи регенерантів на 45 день культивування			
			довжина, мм		кількість коренів, шт.	
	“Патріот”	“Паульс Глорі”	“Патріот”	“Паульс Глорі”	“Патріот”	“Паульс Глорі”
8	28,7	31,2	4,3	3,2	1,2	1,1
16	21,6	25,4	8,9	8,4	3,7	4,9
НІР ₀₅	2,1	3,3	3,2	3,0	1,9	1,8

Регенеранти з експлантів ізольованих із донорів, вирощених за умови довгого фотоперіоду, швидше розпочинали коренеутворення. Так, у сорту “Патріот” різниця становила 7,1 днів, а в сорту “Паульс Глорі” – 5,8. Досліджуваний фактор також впливав на кількість та довжину коренів. У регенерантів сорту “Патріот” вона, згідно з першим показником, змінилася з 1,2 до 3,7 штук на рослину, а довжина збільшилася із 4,3 до 8,9 мм.

Під час підбору виду та концентрації ауксинів виявлено такі залежності: ІОК, як порівняти із ІМК, виявилася менш ефективною для коренеутворення у обох сортів (табл. 6.9). Причиною цього може бути те, що ІМК менше, ніж ІОК, стимулює синтез етилену [82]. Також відомо, що ІМК є більш активним ауксином, порівнюючи із ІОК, а однодольні рослини в середовищах потребують більших концентрацій ауксинів, ніж дводольні [78].



Рис. 6.8. Вплив гормонів на морфогенез регенерантів хости сорту Патріот: зліва надлишок ауксинів (ІМК, 4 мг/л), справа надлишок цитокінінів (БАП, 2,5 мг/л).

Таблиця 6.9.

Вплив ауксинів на ризогенез регенерантів хости

Концентрація фітогормонів	Початок коренеутворення, днів		Розвиток кореневої системи регенерантів на 45 день культивування			
			довжина, мм		кількість коренів, шт.	
	Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі
Без ауксинів (контроль)	49,7	53,2	-	-	-	-
ІОК 1 мг/л	50,3	52,1	-	-	-	-
ІОК 2 мг/л	48,1	53,7	-	-	-	-
ІОК 3 мг/л	47,8	50,6	-	-	-	-
ІОК 4 мг/л	41,2	48,9	-	-	-	-
ІОК 5 мг/л	45,3	47,3	-	-	-	-
ІМК 1 мг/л	16,3	23,1	12,8	17,0	6,3	7,0
ІМК 2 мг/л	13,7	21,8	15,9	18,9	6,9	7,8
ІМК 3 мг/л	13,8	18,4	28,7	31,3	5,1	4,1
ІМК 4 мг/л	12,9	17,9	36,9	47,7	4,1	4,0
ІМК 5 мг/л	21,6	29,4	5,6	19,8	1,7	2,4
НІР ₀₅	4,4	4,9	3,7	4,1	0,7	0,6

Збільшення концентрацій ІМК від 1 до 4 мг/л прискорювало початок коренеутворення і збільшувало довжину коренів. Слід відмітити різницю між регенерантами, вирощеними на середовищах із двома, трьома і чотирма відсотками ІМК. Зростання її концентрації в цих межах у середовищі за умови вирощування регенерантів сорту “Патріот” збільшувало довжину коренів із 15,9 мм до 36,9 мм та зменшувало кількість коренів із 6,9 до 4,1 шт. на рослину. Збільшення концентрації ІМК до 5% спричиняє фітотоксичний вплив: значно зменшувалася кількість коренів та їхня довжина.

Застосування іншого ауксину – 2,4-Д в концентраціях 3 та 4 мг/л було ефективним для збільшення кількості коренів, але вони мали меншу довжину. Концентрація вище 5 мг/л була фітотоксичною.

Для багатьох культур фактором, який детермінує ризогенез, є зменшення концентрації елементів мінерального живлення в середовищі [95]. Нами це підтверджено на хості. Збіднене вдвічі середовище стимулювало ріст кореневої системи. У ньому дія ауксинів проявлялася як з високою (3 мг/л), так і з низькою концентрацією (1 мг/л). Регенеранти, які росли на середовищі з вищою концентрацією ауксинів, за кількістю коренів поступалися рослинам, що виростили на середовищі з 1 мг/л ІМК, але переважали їх за довжиною.

Про детермінуючий вплив на ризогенез зменшених концентрацій елементів живлення (MS1/2) свідчить утворення коренів навіть при знижених концентраціях ауксинів, що не відбувалося за повної мінеральної основи (табл. 6.10). Однак за відсутності ауксинів (ІМК) в середовищі з половинною концентрацією мінеральних речовин у регенерантів спостерігалось пригнічення росту й розвитку коріння (рис. 6.9).

Таблиця 6.10.

Вплив концентрації мінеральної основи та ІМК на ризогенез регенерантів хости

Концентрація		Початок коренеутворення, днів		Розвиток кореневої системи регенерантів на 45 день культивування			
мінеральна основа	ІМК, мг/л			довжина, мм		кількість коренів, шт.	
		Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі	Патріот	Паульс Глорі
Повна	-	50,1	52,8	-	-	-	-
	1	16,4	24,0	12,6	16,8	6,2	6,8
	3	13,8	18,4	28,7	31,3	5,1	4,1
Половинна	-	37,4	41,6	2,3	2,9	1,1	1,4
	1	14,4	19,5	15,9	17,2	7,1	7,3
	3	13,2	17,8	67,9	76,5	6,6	7,1
НІР ₀₅		2,3	1,8	2,0	1,5	2,2	1,7

Окрім згаданих факторів, відомим детермінантом ризогенезу є активоване вугілля. Припускають, що це пов'язано із зв'язуванням ним інгібіторів гормонів, затіненням та додатковою аерацією середовища [78]. Щоб зменшити затрати на активоване вугілля за великих обсягів розмноження нами випробувано заміну цього компоненту на звичайне деревне вугілля, отримане від неповного спалювання деревини плодкових дерев.

Порівнюючи попередньо підібрані концентрації встановили, що немає істотної різниці в застосуванні цих видів вугілля (табл. 6.11). Таким чином, використання вугілля дозволяє зменшити витрати на ІМК, а застосування деревного вугілля також зменшувало витрати на активоване.



Рис. 6.9.
Вплив концентрації мінеральної основи живильного середовища на розвиток регенерантів хости, сорт Патріот
1. Повна концентрація
2. Половинна концентрація.

Таблиця 6.11.
Вплив активованого і деревного вугілля та ІМК на ризогенез регенерантів хости (MS1/2)

Концентрація		Початок коренеутворення, днів		Розвиток кореневої системи регенерантів на 45 день культивування			
Тип вугілля	ІМК, мг/л	“Патріот”	“Паульс Глорі”	довжина, мм		кількість коренів, шт.	
				“Патріот”	“Паульс Глорі”	“Патріот”	“Паульс Глорі”
активоване, 1,5 г/л	-	21,1	32,3	14,3	7,7	3,0	3,7
	1	12,7	15,8	42,7	46,1	7,4	6,6
	3	11,9	14,0	48,3	51,6	7,9	8,0
деревне 2,5 г/л	-	19,5	28,6	37,3	38,9	2,7	3,1
	1	14,4	19,5	45,2	47,2	7,1	7,3
	3	11,2	15,8	47,9	46,5	7,6	8,1
НІР ₀₅		2,1	2,7	4,3	5,6	2,6	2,2

Аналізуючи вище викладене, можна зробити такі висновки.

Детермінантами ризогенезу хости сортів “Патріот”, “Паульс Глорі” є:

- індукує вирощування рослин-донорів екплантів на довгому світловому дні;
- довгий фотоперіод під час регенерації рослин з екплантів;
- додавання в середовище ІМК в концентраціях від 1 до 4 мг/л;
- вирощування регенерантів на збіднених середовищах;
- додавання активованого або деревного вугілля;

Зменшення концентрації мінеральних речовин та додавання вугілля дозволяє знизити концентрацію ІМК у середовищі до 1 мг/л.

6.6. Постасептична обробка регенерантів ауксинами

Укорінення мікропагонів у субстраті безпосередньо після умов *in vitro* можна розглядати як спосіб одночасного самого процесу укорінення та адаптації. Застосовуються два способи використання індукторів ризогенезу на мікропагін: введення в середовище і замочування *ex vitro*. Наприклад, замочування мікропагонів підщеп яблуні, груші в ауксині з концентрацією 100 мг/л впродовж 30 хвилин сприяло не тільки підвищенню вкорінюваності, але і прискорювало процес ризогенезу, порівняно з введенням його в поживне середовище [188]. Подібний технологічний прийом нами випробувано на регенерантах хости (табл. 6.12) – замочування їх впродовж 30 хвилини в 5% розчинах на фоні різних концентрацій цитокініну - бензиламінопурину.

Витримування регенерантів у розчині з найбільшою концентрацією БАП (2,5 мг/л), порівняно з безгормональним контролем, знижувало приживлюваність та ризогенез. Встановили, що дія ауксинів була вищою на середовищах без цитокініну. Збільшення вмісту БАП зменшувало приживлюваність, кількість та довжину коренів.

Таблиця 6.12.

Вплив замочування регенерантів хости в розчинах ауксинів, сорт “Патріот”

Вміст цитокінінів (БАП), мг/л	Ауксин, мг/л	Прижилось рослин, %	Кількість коренів, шт.	Довжина кореневої системи, мм
Без гормонів	-	41	0,6	12
0	ІМК	76	7	29
	2,4 Д	63	9	13
1,0	ІМК	47	8	7
	2,4 Д	38	9	4
2,5	ІМК	25	3	6
	2,4 Д	23	4	2

Ризогенез деревних рослин *in vitro* може проходити добре, наприклад, слива сорт “Трудівниця”, павловнія (рис. 6.10). Але в окремих видів рослин виникає ряд технологічних проблем:

- замість кореня можливе утворення в базальній частині калюсного напливу (рис. 6.11);

- особливістю деяких деревних культур (троянда, лохина) є те, що корінь може утворюватися, але під час пересадки через крихкість він обламується.

Нами випробувано обробку ауксинами регенерантів лохини та кизилу в умовах *ex vitro* (табл. 6.13). Для цього регенеранти віком 1,5 місяці, вирощені на середовищі із мінімальним вмістом цитокінінів (кизил – 0,1 мг/л БАП, лохина – 0,4 мг/л 2-іР), базальною частиною опускали на 25хв у розчин ауксинів (1 мг на 100 мл дистилляту).



слива, сорт “Трудівниця Млієва”

Павловнія

Рис. 6.10. Ризогенез *in vitro*

Встановили, що ІМК у досліджуваній концентрації була не ефективною для регенерантів кизилу. За 1,5 місяці більшість рослин не загинули у цьому варіанті, однак і ризогенезу не було. Тому по завершенню цього періоду регенеранти повторно обробляли, але (вже НОК) і висаджували на субстрат. У регенерантів, які відразу обробляли, ризогенез спостерігався у 61% у сорту “Екзотичний” та 67% у сорту “Ніжний”.

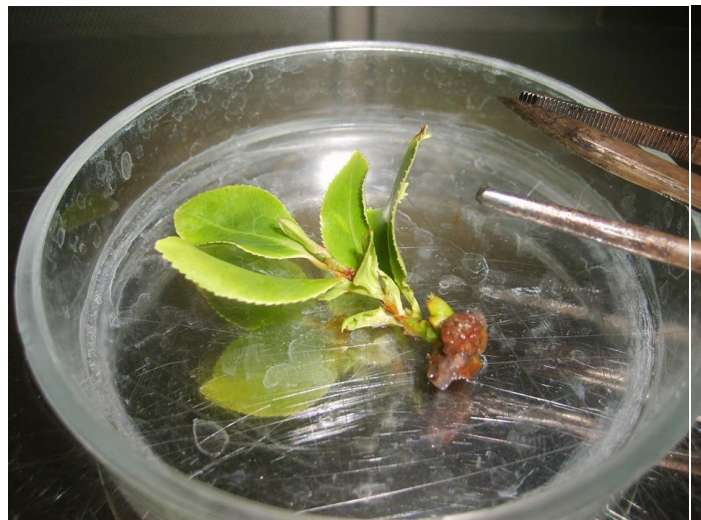


Рис. 6.11. Калюсний наплив в базальній частині регенеранта камелії *in vitro*

Таблиця 6.13.

Вплив постсептичної обробки ауксинами на укорінення регенерантів (об’єм вибірки по 1тис. регенерантів), %

Культура	Без ауксинів	ІМК	НОК
Кизил, сорт “Ніжний”	3	5	67
Кизил, сорт “Екзотичний”	0	2	61
Лохина, сорт “Bluescop”	14	84	23
Лохина, сорт “Patriot”	27	96	35

Водночас за обробки ІМК сорти лохини краще формували кореневу систему, ніж за обробки НОК.

6.7. Захист рослин на етапі *in vitro* – *in vivo* від шкідливої мікрофлори ґрунту під час висадки розсади

Для кращої адаптації рослин *in vitro* створюють контрольовані умови з підвищеною температурою та високою вологістю повітря. Водночас вони сприятливі для інтенсивного розвитку мікрофлори, зокрема мікроскопічних сапрофітних грибів, що поселяються на ослаблених під час стресу рослинах (рис. 6.12). За нашими спостереженнями ці організми, мацеруючи тканини, знищують рослини за 1-2 тижні.



Рис. 6.12. Заселення рослин хости *ex vitro* сапрофітними грибами

Для захисту рослин *ex vitro* від мікроорганізмів застосовують біологічні та хімічні методи. З біологічних методів вдалим є застосування мікробіологічних препаратів КЛЕПС® на основі корисних бактерій *Pseudomonas* spp. (3 strains) та *Pseudomonas putida*, розроблених Інститутом молекулярної біології та генетики НАН України, в нормі 0,5 мл/л і біопрепарату “Байкал ЭМ-1” – вироблені Російській Федерації, в нормі 1 мл/л [61]. За умови їхнього використання виявлено істотно краще приживлення живців пробіркових рослин, збільшення частки повноцінної касетної розсади картоплі. Однак, виявлена специфічність взаємодії біологічних особливостей сортів та корисних мікроорганізмів.

Хімічні методи передбачають як обробку тепличних субстратів, так і рослин. Із залученням у дослідження рослин хости (табл. 6.14) порівнювали ефективність обробки субстратів (на основі торфу) двома речовинами: фундазол (д.р. беноміл) та ризолекс (толклофос-метил) та обробку розсади нітратом срібла, “Максим Форте 050 FS” т.к.с. – Syngenta і “Превікур Енерджи 840 SL”, в.р.к. – Bayer Garden.

Найбільше, 89,5% рослин, прижилося за умови замочування їх перед висадкою у “Превікур Енерджі 840 SL”, що виявилось в 2,5 рази більше, ніж у контролі. Близькі дані отримані при використанні для замочування розсади препарату “Максим Форте 050 FS” – 72,1% та обробки субстратів препаратом “Ризолекс” – 77,3. Тобто вони за проявом показника мали близький ефект до замочування розсади в “Превікур Енерджі 840 SL”. Проте, з організаційної точки зору, замочування рослин є менш трудомістким та екологічно безпечнішим. Оскільки “Превікур Енерджі 840 SL” є системним фунгіцидом пізніше його використання спростили до обприскування висаджених рослин.

Таблиця 6.14.

Ефективність обробки субстратів та рослин на вихід розсади хости, сорт “Патріот”.

Варіант		Прижилося рослин, %	Маса рослин, г	Кількість листків, шт.
Контроль (без обробки субстрату і розсади)		35,6	0,48	3,68
Обробка субстрату	“Ризолекс”	77,3	0,79	5,23
	“Фундазол”	41,2	0,65	4,12
	AgNO ₃	46,3	0,82	5,57
Замочування розсади	“Превікур Енерджі 840 SL”	89,5	0,94	5,93
	“Максим Форте 050 FS”	72,1	0,73	5,45
НІР ₀₅		4,3	0,08	0,7

Окрім приживлення розсади, досліджували вплив препаратів на онтогенез рослин. Найменша їх маса (0,48 г) та найменша кількість листків (3,68 шт. на рослину) була в контролі. Вважаємо, що це пов’язано із постасептичним стресом та ушкодженням мікрофлорою. Найбільшими за масою були рослини після використання “Превікур Енерджі 840 SL”, із середнім проявом першого показника – 0,94 г. Аналогічне стосувалося кількості листків – 5,93 шт. Варіант із використанням AgNO₃ відрізнявся за морфогенезом листка. Особливість рослин варіанту – велика листкова пластинка та короткий черешок.

6.8. Фотоавтотрофний метод МКРР

Мікроклональне розмноження рослин все дедалі більше знаходить комерційне застосування у промисловому вирощуванні як декоративних, так і сільськогосподарських культур. Водночас ці методи через міксотрофне із дуже високою часткою гетеротрофного живлення рослин *in vitro* мають ряд недоліків, що впливають на технологічність такого розмноження:

1. Високі затрати на органічні компоненти середовищ, в т.ч. гормони, агар, сахарозу.
2. Фізіологічні проблеми в рослинних об’єктах пов’язані зі змінами при переходах *in situ* – *in vitro* – *ex vitro* – *in situ*. Зокрема, через проблеми із постасептичною адаптацією регенерантів *in vitro* втрати рослин можуть становити 70 % і більше.
3. Тривалий час на утворення повноцінної системи та фотоасимілюючих органів.

Тому поряд із гетеротрофними методами МКР у останні десятиліття все ширше застосовують фотоавтотрофний метод МКР (далі ФАМКР). З одного боку це удосконалене зелене живцювання, а з іншого – застосовуються нові підходи, зокрема інтенсифікація фотосинтезу *in vitro*.

6.8.1. Вплив розмірів фотоасимілюючих органів на укорінення регенерантів фундука за ФАМКР

Оскільки фотоавтотрофний метод передбачає розмноження без застосування екзогенних вуглеводнів, то дуже важливим є формування нових та збереження донорних листків як основних фотоасимілюючих площ під час живцювання. Нами під час живцювання фундука методом ФАМКР встановлено вплив розмірів листка на інтенсивність коренеутворення (табл. рис. 6.13.).

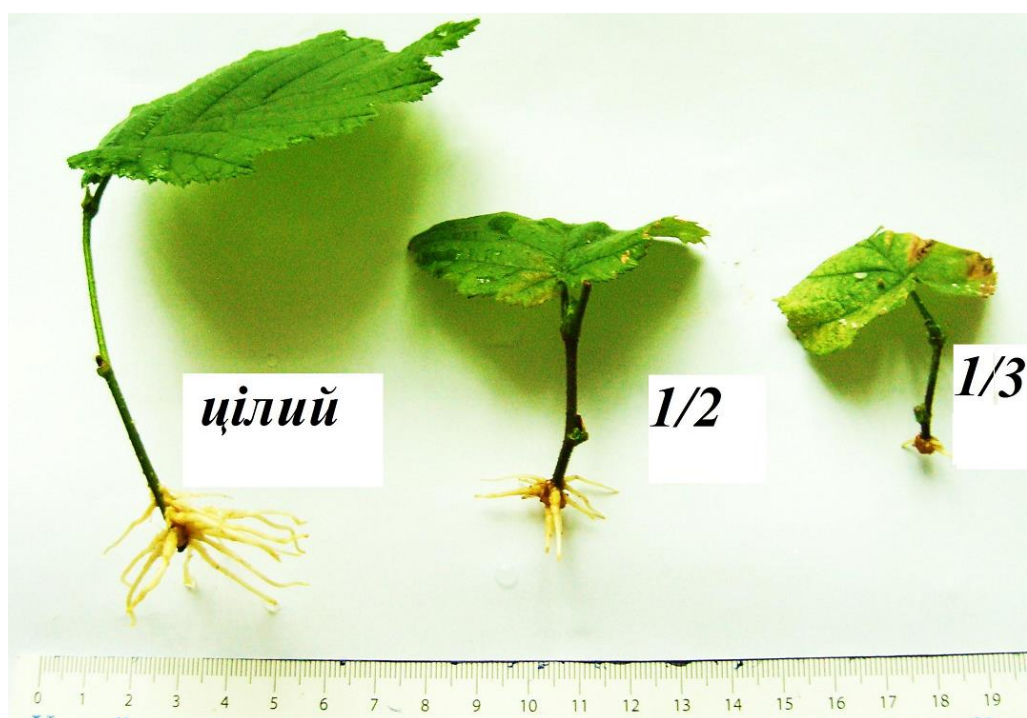


Рис. 6.13. Вплив розмірів листка на інтенсивність коренеутворення фундука під час ФАМКРР, сорт “Трапезунд”

Таблиця 6.15.

Вплив розмірів листка на інтенсивність коренеутворення фундука під час ФАМКРР, сорт “Трапезунд”

Кількість листової пластинки	Початок коренеутворення, діб	Довжина коренів на 30 день культивування, мм
Ціла	18±2	29±5
1/2	29±4	3±2
1/3	56±5	-

Згідно отриманих даних технологічно придатними є живці із цілим листком. У цих регенерантів у три рази швидше (в середньому по варіанту на 18 добу) утворюються корені, ніж в живців, що мали 1/3 листка. В них на 21-23 добу розпочинається формування коренів другого порядку. Через місяць на цьому варіанті приріст пагона становив 21-39 мм із, в середньому 2,3 шт. новоутворених міжвузлів.

Отже, за відсутності екзогенних вуглеводнів ризогенез живців фундука пов'язаний із розміром листків фундука.

6.8.2. Вплив екзогенних фітогормонів на розвиток регенерантів ожини (*Rubus fruticosus* L.) за ФАМКРР та заходи зниження їх контамінування в постасептичній культурі

МКР дозволяє культивувати в промислових масштабах безвірусні, генетично однорідні рослини, проте, після переведення регенерантів в умови *ex vitro*, їх кількість може зменшуватися в десятки разів. Таке значне зниження приживлення рослин-регенерантів пов'язане, насамперед, із їхньою неспроможністю швидко адаптуватися до зміни умов культивування. В факторостатичних умовах культури *in vitro* формується міксотрофний, із переважаючим гетеротрофним, тип живлення, тоді як в умовах *ex vitro* живлення рослини відбувається за автотрофним типом. Перенесення в умови *ex vitro* зумовлює виникнення у регенерантів стресу, зокрема через пригнічення фотосинтетичної активності тканин в умовах *in vitro* [177, 200]. Стресовий вплив умов культивування у постасептичній культурі спричиняє зміни у фітогормональному балансі рослин [78, 92]. Крім того, вплив стресу призводить до зниження захисних резервів рослин, тому вони активно заселяються як сапрофітною, так і патогенною мікрофлорою. Таким чином, при адаптації регенерантів до умов *ex vitro* необхідні додаткові заходи, які б підвищували їхню здатність до виживання. Тому ми дослідили вплив екзогенних фітогормонів, положення живців і вік регенерантів на ефективність постасептичної адаптації та розмноження регенерантів ожини (*Rubus fruticosus* L.), а також розробку заходів зниження контамінації рослин в умовах *ex vitro*.

Регенеранти *in vitro* ожини *Rubus fruticosus*, L. сорту "Reuben" культивували на живильному середовищі за прописом Мурасіге-Скуга із модифікаціями згідно з варіантами дослідження. Базовим був варіант із вмістом мінеральної частини живильного середовища – 100% за прописом. Вміст фітогормонів складав: аденіну – 0,25 мг/л; БАП – 0,5 мг/л та ІМК 0,1 мг/л. Модифіковане живильне середовище містило мінеральну частину – 50% за прописом, вміст фітогормонів становив: аденіну – 0,016 мг/л; БАП – 0,032 мг/л; ІМК – 1,5 мг/л. Враховували морфометричні показники розвитку рослин, а також відмічали вплив тривалості культивування регенерантів в умовах *in vitro* та походження регенерантів із різних зон стебла материнських рослин на подальше приживання в умовах *ex vitro*.

Для дослідження регенераційної здатності рослин ожини в постасептичних умовах проводили живцювання на перлітовий субстрат регенерантів, адаптованих до цих умов, та проаналізували вплив застосування трьох екзогенних синтетичних фітогормонів різних класів на особливості морфогенезу живців *ex vitro*. Використовували гіберелін (гіберелінова кислота А₃) у концентрації 1 мг/л, ІМК – 2,5 мг/л і БАП – 0,6 мг/л. Також застосовували комбінації цих фітогормонів: Гіберелін (1 мг/л)+ІМК(2,5 мг/л) та БАП (0,6 мг/л)+ІМК(2,5 мг/л). Контроль – живильне середовище без фітогормонів. Використовували живці із медіальної частини регенерантів, оскільки існує градієнт ендогенних фітогормонів уздовж пагона рослини [92].

В умовах *ex vitro* рослини культивували при температурі $24 \pm 2 \text{ C}^0$ в ємностях із регулюванням вологості та газового складу повітря. Для цього у спеціальному баку готували необхідну суміш із повітря, води та вуглекислого газу, яку подавали у ємності [199]. Склад мікрофлори, що заселяла регенеранти в умовах *ex vitro*, встановлювали за допомогою стереомікроскопа при збільшенні 1x40 згідно з Билай В.И. та ін. [10]. Для запобігання бактеріального контамінування в живильний розчин додавали 1,5 мг/л AgNO₃. Умови застосування фунгіцидів приведені у таблиці 6.16. Облікова кількість рослин 240 шт., повторність досліду чотирикратна.

Таблиця 6.16.

Схема та умови застосування препаратів у досліді

Варіанти	Препарат	Умови застосування
1	контроль	
2	Фундазол 0,5 г/л	Додавання в живильний розчин та обприскування рослин через три дні упродовж культивування
3	Топсін М 0,5 г/л	Обприскування рослин через через три дні упродовж культивування
4	Топсін М 0,75 г/л	Обприскування рослин упродовж культивування через п'ять днів
5	Превікур Енерджі 0,375 г/л	Обприскування рослин упродовж культивування через два дні
6	Превікур Енерджі 0,75 г/л	Обприскування рослин упродовж культивування через три дні
7	Превікур Енерджі 1,5 г/л	Обприскування рослин упродовж культивування через п'ять днів

Відомо, що індукування ризогенезу відбувається при збалансуванні вмісту фітогормонів у живильному середовищі за умови переважання ауксинів над цитокінінами згідно з правилом Скуга-Міллера [95]. На базовому середовищі для розмноження із переважанням цитокінінів лише незначна кількість регенерантів – 6-10% прижилися за постасептичних умов (табл. 6.17.).

Також збільшувалась довжина та кількість коренів, що свідчить про позитивний ефект на розвиток кореневої системи підвищеного вмісту ауксину за умов *in vitro*. Загалом, регенеранти, які культивувалися в умовах *in vitro* на модифікованому середовищі, при перенесені їх у постасептичні умови адаптувалися набагато краще, приживання рослин підвищувалось на 81-89%, порівняно із базовим варіантом.

Крім того, встановлено, що на приживання в постасептичних умовах рослин впливав і вік регенерантів. Так, із 15-денних рослин приживалися 86-91 %, тоді як у регенерантів, які культивували в умовах *in vitro* 30 днів, приживання в умовах *ex vitro* становило 91-99 %. Подальше підвищення віку регенерантів, перенесених в постасептичні умови, знижувало їх приживання. Так, у 45-денних регенерантів приживання становило 88-94 %, у 60-денних – 84-90 %, а з регенерантів, які культивували в умовах *in vitro* 90 днів, прижилося 63-74 %.

Таблиця 6.17.

Індукція ризогенезу у регенерантів *in vitro* ожини в постасептичних умовах

Варіанти живильного середовища	Довжин а коренів, мм	Кількість коренів, шт.	Висота рослини, мм	Кількість пагонів в конгломераті, шт.	Приживання в умовах <i>ex vitro</i> , %.
Базове	3±2	2±2	129±7	4,7±0,3	6±4
Модифіковане	17±4	6±2	86±7	1,5±0,2	91±8

Для дослідження регенераційної здатності рослин ожини за постасептичного живцювання вивчали дію чинників: 1) екзогенних фітогормонів 2) положення живця на материнській рослині. Останній чинник може бути досить важливим для успішного вегетативного розмноження ожини, оскільки відомо, що проксимальні до верхівки ділянки стебла мають вищу проліферативну активність, ніж дистальні [177].

Встановлено, що в контрольному варіанті без застосування екзогенних фітогормонів коренеутворення у живців розпочиналося на 27 день культивування, тоді як у варіанті із застосуванням ІМК – вже на 14 день (табл. 6.18.). Застосування ГК у комбінації із ауксином, а також БАП у комбінації із ІМК та самостійно також подовжувало період до коренеутворення.

Таблиця 6.18.

Вплив фітогормонів на особливості постасептичного розмноження живців ожини *ex vitro* (45 день культивування)

Варіанти	Початок, днів		Розвиток кореневої системи		Форми листків	Довжина листкової пластинки, мм
	ризо-генезу	розвитку пагонів із бруньок	довжина, мм	кількість коренів, шт.		
Контроль, без фітогормонів	27±4	12±1	19±4	4±1	прості ювенільні	5-8
ГК	43±6	7±4	5±3	2±1	трійчасті	3-5
ГК+ІМК	38±6	9±5	9±3	5±2	трійчасті	4-6
ІМК	14±3	12±4	38±6	7±3	прості ювенільні	15-20
БАП	47±7	9±3	-	-		7-9
БАП+ІМК	31±4	11±3	7±4	9±3		10-14

Найвищі показники розвитку кореневої системи спостерігалися у варіанті із застосуванням індолілмасляної кислоти, оскільки на 45 день культивування рослин у цьому варіанті за довжиною коренів перевищували контрольні рослини у 2 рази. Більшою в 1,8 раз, в розрахунку, на один регенерант була і кількість коренів, які утворилися.

Наявність екзогенного гібереліну у живильному розчині зумовлювала витягування новоутворених пагонів та зниження їх товщини. Листки рослин у цьому варіанті були дрібними, трійчастими, що свідчить про втрату ювенільності. Наступні живцювання таких пагонів призводили до загибелі близько 80% живців під час регенерації. Водночас, у варіанті із використанням БАП часто спостерігали утворення 2-4 мікропагонів (рис.6.14.), які при посадці на середовище із ІМК (2,5 мг/л) добре укорінювалися.

У варіанті із додаванням ІМК рослини мали найбільш розвинену кореневу систему, що очевидно забезпечувало оптимальний фітогормональний баланс. Це в свою чергу обумовило кращий розвиток листових пластинок.

За умови повторного живцювання укорінених живців рослин ожини в умовах *ex vitro* (2 пасаж) встановлено значну відмінність в темпах регенерації між живцями, що походили із різних частин пагона материнської рослини, тобто апікальні або медіальні живці (рис. 6.15., табл. 6.19.).



Рис. 6.14. Укорінений живець ожини, вирощений на живильному розчині із додаванням БАП та ІМК



Рис. 6.15. Вплив походження живців та вмісту ІМК у живильному розчині на розвиток рослин:

- 1 – апікальний живець, ІМК; 2 - апікальний живець, без ІМК;
- 3 – медіальний живець, ІМК; 2 - медіальний живець, без ІМК.

Із апікальних живців регенерувалися значно більші рослини. Додавання ІМК у живильний розчин покращувало процес утворення рослин як із апікальних, так і з медіальних живців. Найбільші регенеранти були отримані у варіанті із апікальними живцями та додаванням ІМК. Середня маса рослини на 30 день культивування у цьому варіанті у 2 рази перевищувала рослини із відповідного варіанту за відсутності ауксину, та у 5,3 раз – рослини із варіанту з медіальними живцями і використанням екзогенного ауксину.

Лише незначна кількість медіальних живців у варіанті без екзогенного ауксину приживалася в касетах, а після додавання в живильний розчин ІМК показник приживання зростав до 71%. Із апікальних живців приживалося 92 % та 96 % регенерантів відповідно у варіантах без ІМК та за наявності в розчині цього ауксину. Таким чином, приживання та розвиток рослин ожини із живців регенерантів за умов постасептичної адаптації контролюються ауксином. Це необхідно враховувати при мікроклональному розмноженні цієї культури.

Таблиця 6.19.

Вплив типу експлантів на регенерацію рослин ожини *ex vitro* за умови повторного субкультивування станом на 30 день культивування

Тип живця	Наявність ІМК у живильному середовищі	Приживання рослин, %	Розвиток кореневої системи		Маса рослини, г
			довжина, мм	кількість коренів, шт.	
апикальний	+	96±3	68±7	10±2	11,73±3,12
апикальний	-	92±4	53±5	6±2	5,76±0,67
медіальний	+	71±10	31±6	4±2	2,22±0,34
медіальний	-	9±6	5±3	1±1	0,94±0,18

При дослідженні складу мікрофлори, яка заселяла регенеранти в умовах *ex vitro* встановили, що контамінанти були представлені переважно цвілевими грибами, зокрема представниками роду *Aspergillus*.

Деконтамінуюча активність фунгіцидів щодо вказаних мікроорганізмів залежала від вологості повітря, препарату та способу його використання (табл. 6.20.). Відмічено, що на контролі без застосування фунгіцидів ураження рослин із подальшою їх загибеллю становила 86 % за низької вологості повітря, а в умовах високої вологості повітря гинули всі рослини. У варіанті із застосуванням контактного фунгіциду фундазолу втрати рослин за обох рівнів вологості повітря були близькими до контролю.

Застосування фунгіциду Топсін М порівняно із контролем залежно від способу застосування зменшувало на 17-24 % кількість уражених рослин. За 100 % вологості у варіанті із вказаними фунгіцидом живими залишалось 5-7%. На цих варіантах відмічено пригнічення росту рослин, зокрема менші біометричні розміри пагона.

Також по усіх варіантах пригнічувався ріст при 100 % вологості повітря. Припускаємо, що це пов'язано із активуванням метаболічних процесів, властивих анаеробному диханню рослин. Найбільш ефективним виявилось застосування препарату “Превікур Енерджі” у дозі 1,5 г/л за обприскування упродовж культивування через п'ять днів, оскільки у цьому варіанті приживання регенерантів становило майже 98% за низької вологості повітря, та 79-85% – за високої вологості повітря.

Таблиця 6.20.

Ефективність застосування фунгіцидів за постасептичного вирощування рослин ожини *in vitro* на 30 день культивування

Варіанти	Інфікування рослин, %		Висота рослин, мм	
	70 % вологості повітря	100 % вологості повітря	70 % вологості повітря	100 % вологості повітря
1	86±4	100	47±3	-
2	82±4	100	48±4	-
3	69±5	95±5	36±3	9±4
4	51±5	93±6	34±2	9±3
5	36±8	57±10	51±6	26±5
6	7±3	21±9	57±6	31±5
7	2±1	11±4	59±5	33±6

Отже, стосовно досліджень постасептичного культивування ожини можна зробити такі висновки:

1. Підвищення вмісту ауксину у живильному середовищі до 1,5 мг/л та культивування в умовах *in vitro* не більше 30 діб збільшувало приживання регенерантів ожини в постасептичній культурі до 91-99 %.

2. У приживленні та розвитку рослин-регенерантів ожини із живців за умов постасептичної адаптації провідну роль відіграє ауксин, оскільки найвищі показники розмноження та розвитку регенерантів одержані при використанні екзогенної індолілмасляної кислоти. Це необхідно враховувати при розробці протоколу мікроклонального розмноження цієї культури.

3. Встановлено, що в постасептичній культурі контамінування рослин відбувається за участю грибів роду *Aspergillus*. Заходи захисту регенерантів ожини повинні включати застосування препарату “Превікур Енерджі 840 SL” у дозі 1,5 г/л, а також заходи по зниженню вологості повітря, що сприяє підвищенню показників розвитку рослин та зниженню їх контамінування.

6.8.3. Вплив інтенсивності освітлення та вмісту CO₂ в повітрі на ефективність ФАМКР ожини

Утворення коренів, як і усього тіла регенеранта, залежить від інтенсивності утворення та перетворення пластичних речовин. Кількість первинної органічної речовини в свою чергу за відсутності екзогенної сахарози пов'язана з інтенсивністю фотосинтезу. Основою фотосинтезу є світло та вуглекислий газ. Одним із показників, що свідчить про фотосинтетичну активність і успішність постасептичної адаптації та розмноження є накопичення маси рослин. На цей процес впливають фактори, що стимулюють утворення пластичних речовин за участю фотосинтезу: світло як носій енергії та вміст вуглекислого газу як вихідної сполуки для синтезу органічних речовин (рис. 6.16.).

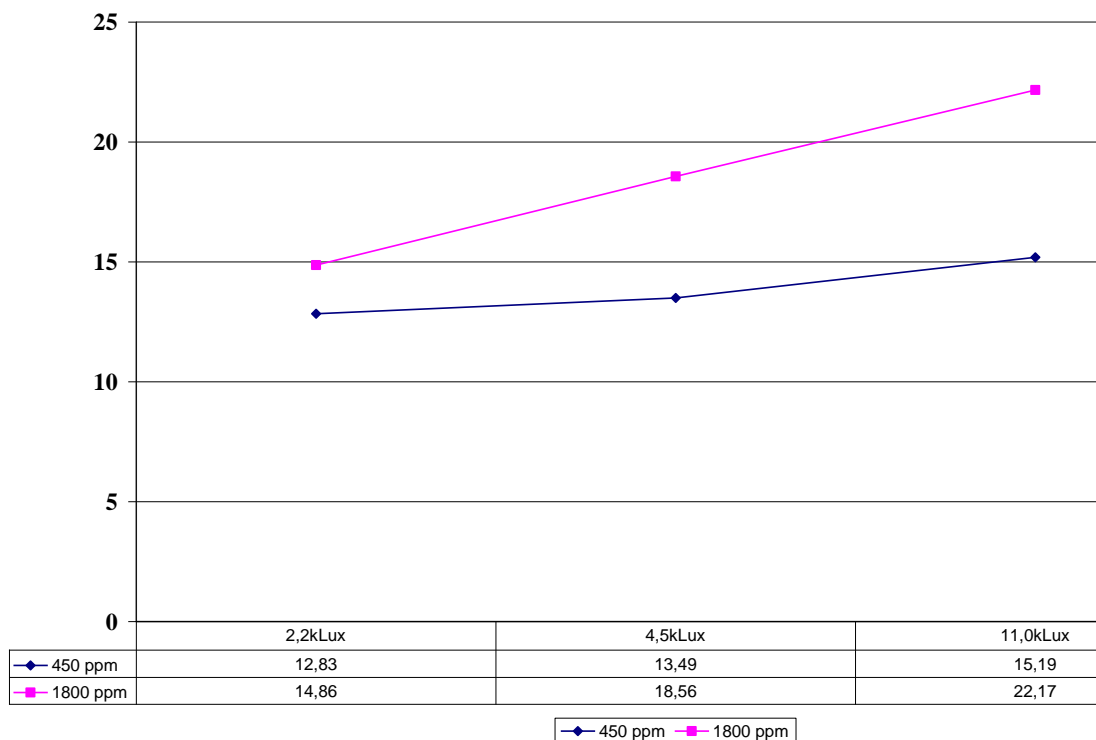


Рис. 6.16 Вплив освітлення та вуглецевого живлення на масу рослин із живців *ex vitro* на 30 день культивування

Встановили, що збільшення інтенсивності освітлення із 2,2 kLux до 11,0 kLux при звичайному вмісті повітрі CO₂ (450 ppm) збільшувало масу рослин із 12,83 г до 15,19 г тобто на 18 відсотків. У випадку чотирикратного збільшення вмісту CO₂ маса рослин зростала до 22,17 г, тобто на 72 відсотки.

Також, окрім збільшення розмірів при максимальному інтенсивному забезпеченні вуглекислим газом і інтенсивному освітленні рослин, регенеранти були придатними до повторного живцювання вже на 15-18 добу, тоді як за мінімального освітлення і мінімального вмісту CO₂ регенеранти були придатними до живцювання через 1-1,5 місяці. У такий спосіб інтенсифікація процесу фотоасиміляції при ФАМКРР дозволяє отримувати більші регенеранти протягом коротшого часу.

Отже, відмічена синергічна взаємодія ФАМКРР двох факторів за впливом на фотосинтез: збільшення інтенсивності освітлення до 11000 Lux та збільшення концентрації вуглекислого газу із 450 до 1800 ppm.

VII. ЗБЕРЕЖЕННЯ ЯКОСТЕЙ МАТЕРІАЛУ, ОТРИМАНОВОГО IN VITRO В ПРОЦЕСІ РОЗМНОЖЕННЯ

Для більшості видів рослин обов'язковим є поєднання МКР з оздоровленням, хоча процес звільнення від вірусів, віроїдів, бактерій та інших патогенів не оберігає посадковий (насіenneвий) матеріал від повторного інфікування, тобто реінфекції. Необхідність оздоровлення вихідного насінневого матеріалу найбільш актуальна в матеріалі для МКРР в таких галузях рослинництва як картоплярство, хмелярство та плідництво.

7.1. Збереження якостей оздоровленого матеріалу у безвірусному насінництві картоплі

Оздоровлений насінневий матеріал за наявності джерел та векторів вірусної інфекції повторно інфікується, а згідно із даними деяких авторів, [12, 18] він є навіть, більш схильним до реінфекції, ніж отриманий іншими методами.

Існує зворотна залежність між продуктивністю і ураженістю оздоровленого матеріалу. Реінфекція в картоплі за три роки репродукування може становити від 4 до 47% [47]. У Інституті картоплярства НААНУ у перший рік вирощування за відсутності просторової ізоляції повторне зараження рослин вірусами становило 7%, а на другий рік – 32%. На думку німецьких спеціалістів, інтенсивність перезараження оздоровленої картоплі в таких умовах може сягати 30% за один рік репродукування [149].

Тому під час вирощування насінневої картоплі на безвірусній основі особливо важливо використовувати спеціальні технологічні заходи, направлені на захист від повторного зараження вірусними та іншими хворобами [12, 44].

Захист оздоровленого матеріалу за розмноження в закритому ґрунті. Вирощування безвірусного матеріалу в закритих парниках, теплицях дає можливість ізолювати його від зовнішньої інфекції і контролювати умови вирощування. Також в умовах закритого ґрунту краще проходить адаптація рослин в процесі *ex vitro*.

Проте можливою є поява переносників навіть у цих спорудах. Велику небезпеку в закритому ґрунті являє така категорія переносників інфекції, як попелиці. Температурний режим та висока вологість в теплицях особливо сприятливі для найактивнішого переносника – перикової попелиці [164]. Також у цих умовах у процесі отримання бульб складно досягти високого коефіцієнту розмноження: обмежена площа живлення оздоровленого матеріалу, не зовсім ідентичні умови, у порівнянні із зовнішнім середовищем, тощо.

Захист оздоровленого матеріалу за вирощування у відкритому ґрунті. Досягнення високих коефіцієнтів розмноження з найменшими втратами якості – головна проблема під час репродукування оздоровленого матеріалу в полі. У системі захисту вагому частину займають заходи з контролю наявності попелиць. У відкритому ґрунті на картоплі зафіксовано їх понад 40 видів, причому віриформні властивості мають не тільки специфічні для картоплі, але й неспецифічні: капустиана, горохова, осотова, велика злакова, яблунево-злакова та інші [92, 164]. Також існує загроза контактної-механічної передачі вірусів у наслідок обробки міжрядь. Небезпеку з цього погляду також можуть становити бур'яни [92] та культури, що вирощуються на сусідніх полях і можуть бути резерваторами вірусної інфекції. У процесі захисту від попелиць у польових умовах у комах може виникати резистентність до афіцидів, що за умови високого інфекційного фону призводить до масового перезараження матеріалу [113, 164].

Значне місце в процесі вирощування здорового насінневого матеріалу займають профілактичні заходи, що перешкоджають заносу на картопляні поля вірусної та іншої інфекції. Дотримання просторової ізоляції залишається одним із основних заходів запобігання переносу вірусів від інших рослин-господарів. Це ж стосується бур'янів, які не тільки знижують урожайність картоплі на 15-20%, але й спричинюють перезараження оздоровлених рослин вірусами, оскільки приваблюють переносників вірусних хвороб і є резерваторами вірусної інфекції [57, 113].

У процесі вирощування здорової насінневої картоплі необхідним є виконання всього комплексу захисних заходів. Хімічний захист від попелиць ефективний тільки щодо обмеження передачі персистентних (стійких) вірусів (LBK). Пестициди (інсектициди, афіциди) не в змозі попередити перенесення неперсистентних (нестійких) вірусів на сусідні рослини. Крім цього, хімічний захист не усуває передачі вірусної інфекції механічним шляхом під час агротехнічних заходів догляду [2, 11, 25, 47].

Вирощувати насінневий матеріал в умовах відкритого ґрунту складно ще й через концентрацію сільськогосподарського виробництва, бо нерідко складно витримати просторову ізоляцію від товарних посівів картоплі та інших можливих джерел вірусної інфекції. Згідно положення з насінництва картоплі [25] відстань насінницьких посівів від резерваторів та переносників інфекції, зокрема попелиць, має бути не менше 500 м. Однак віруси мають декілька господарів, і інфекція може бути на сусідній культурі, на бур'янах, у лісосмугах, садах і пасовищах та на необроблюваних ділянках землі.

В умовах відкритого ґрунту оздоровлений матеріал складно повністю захистити від повторного зараження [2, 11, 25, 47], що і викликає сумніви надійності цього методу як ланки процесу оздоровлення картоплі від вірусної інфекції.

Отже, актуальним є удосконалення заходів, спрямованих проти джерел та векторів вірусної інфекції з метою збереження якостей оздоровленого матеріалу. Вивчаючи видовий склад і особливості динаміки вірусної інфекції в садивному матеріалі картоплі,

ми [83], виявили, що кількість заражених рослин у насінницьких посівах лабораторії клонального мікророзмноження Інституту картоплярства НААН зростає в процесі репродукування.

Зокрема, впродовж 1996-1998 років встановлено, що зараженість рослин вірусною інфекцією зросла від 0 до 8,3% у сорту "Світанок київський" і від 20 до 75% у сорту "Луговська" (рис. 7.1).

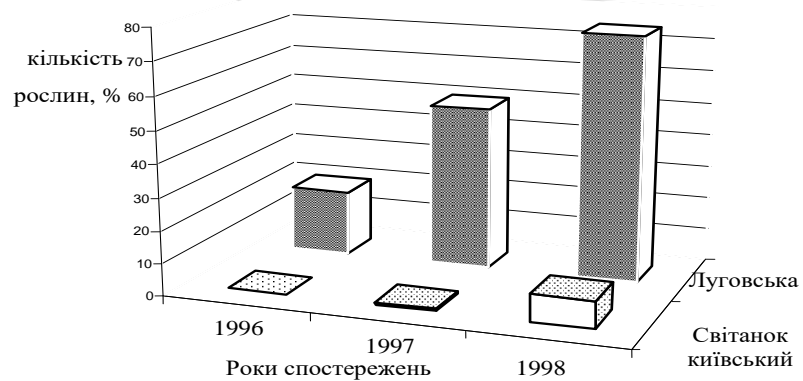


Рис. 7.1. Динаміка накопичення вірусних рослин у садивному матеріалі, сорти "Світанок київський", "Луговська", 1996-1998

Результати цих досліджень співпадають із даними інших авторів [11, 47, 172]. Інтенсивність зниження продуктивності рослин залежить від реінфекції оздоровленої картоплі, яка в процесі розмноження еліти впродовж трьох років сягає 40-56% [47]. Характер наростання кількості інфікованих рослин залежить і від сортових особливостей матеріалу [11, 47].

Проведена нами оцінка реінфікування оздоровленого матеріалу у сортів “Луговська”, “Поляна”, які є найбільш сприйнятливими до повторного переваження, підтвердила наведені вище дані. За вирощування розсади сорту “Луговська” в польових умовах вже на період початку бутонізації рівень реінфекції становив 40 – 50%, а під час другого обліку – понад 60%. Однак за вирощування матеріалу у тепличних умовах не виявлено хворих рослин як візуально, так і методом імуноферментного аналізу.

За висадки оздоровленого матеріалу в поле мінібульбами загальна реінфекція на 2 рік вирощування матеріалу від рослин, отриманих в польових умовах, становила майже 100%, а серед матеріалу, отриманого в теплиці, частка інфікованих рослин становила лише 20-30%. Крім цього, встановлено різні темпи проходження фенофаз рослинами з мінібульб [90]. Вирощені із тепличних мінібульб на 4-5 днів швидше вступали в фази бутонізації та цвітіння і мали на 5-7 см вищу висоту, порівняти з рослинами, які вирости із польових мінібульб. Як порівняти з садінням тепличними міні бульбами, урожайність польових мінібульб у сорту “Луговська” знижувалася на 21,6%, а в сорту “Поляна” - на 27,8%.

На нашу думку, така різниця в рівнях повторного перезараження відбувається навіть за обробки рослин афіцидами (“Конфідор”, “Актара”), оскільки під час використання цих речовин попелиця певний час живиться на рослинах, а отже, може переносити вірус.

За великої чисельності переносників відбувається транспорт інфекції із джерела до оздоровлених рослин *ex vitro*, які привабливі для шкідників через свій молодий вік. У тепличних умовах, якщо й є переносник, то він переходить від здорової рослини до здорової, за умови відсутності в приміщенні джерел інфекції і реінфекція не відбувається. Тобто в транспортному ланцюгу вірусної інфекції відсутня відправна точка. Ймовірно, такі умови можна створити і у відкритому ґрунті, але залишається невирішеними такі проблеми, як об’єм матеріалу для створення загального здорового фону; дотримання просторової ізоляції від інших посівів; перенос вірусної інфекції в процесі агротехнічного догляду тощо.

Таким чином, вихідний матеріал (мінібульби), отримані в закритому ґрунті, мають менший рівень реінфекції, а вирощування матеріалу *ex vitro* в польових умовах вимагає пошуку шляхів створення умов адаптації рослин та зниження інфекційного фону, захисту від переносників.

7.2. Система заходів із захисту картоплі від вірусних хвороб

Явище виродження картоплі спричиняються переважно двома групами причин, між якими часто неможливо провести чітку межу: 1) несприятливі умови навколишнього середовища, особливо підвищені температури в період бульбоутворення, що пов’язано з виродженням картоплі (переважно на півдні); 2) вірусні хвороби.

Уникнути виродження, спричиненого вірусними хворобами, шляхом ізоляції від сусідніх картопляних полів недостатньо, оскільки інфекція може бути не тільки на картоплі, але й на інших рослинах, як на культурних так і на дикорослих. Тому одночасно з ізоляцією необхідно проводити знищення всієї рослинності, яка може бути джерелом інфекції. На виробництві це створити досить складно.

За спеціалізацією щодо господарів віруси розподіляють на дві групи: вузька та широка. За вузької спеціалізації (S вірус картоплі) господарями збудника хвороб можуть бути один або декілька близьких видів рослин [110, 128]. У таких умовах віруси пристосовуються до стійкої циркуляції в межах культури, поширюючись насінням та садивним матеріалом. Віруси широкої спеціалізації мають велике коло рослин-живителів. Так, вірус мозаїки люцерни уражує 92 види рослин із 28 родин, а до вірусу мозаїки тютюну сприйнятливі 236 видів із 33 родин [128].

Віруси з широкою спеціалізацією дуже тісно пов'язані з природними джерелами інфекції і поширюються різними видами комах, створюючи, при цьому численні резервації серед диких рослин.

На поширення вірусів картоплі суттєво впливають бур'яни: молочай, кульбаба, берізка та інші, що є первинними кормовими рослинами попелиць-переносників, та культурні рослини інших ботанічних видів: томати, люцерна, перець, горох, капуста [232].

Джерелом патогенів, крім різних рослин-господарів, можуть бути віруси, що розмножуються в комах (персистентні віруси), а також рослинні рештки, пилок та насіння інфікованих рослин, хронічна, звичайна ендемічна і вмонтована в геном рослини інфекція [9].

Поширення вірусів у природі в зв'язку з облігатним паразитизмом передбачає їх передачу від інфікованого джерела-донора акцептору шляхом проникнення в клітини. Передача вірусів відбувається механічним перенесенням за вегетативного насінневого розмноження та векторним способом за участю комах, кліщів, нематод та фітопатогенних грибів [75, 128].

Механічні та векторні способи передачі інфекції пов'язані з пошкодженням захисних тканин сприйнятливої рослини. За умови механічного способу передачі інфекції відбувається контакт системно інфікованих хворих і здорових рослин під дією таких природних факторів, як вітер, переплетіння рослин під час полягання, дії людини під час заходів догляду за рослинами. У цьому випадку відбувається пошкодження клітин поверхневих тканин рослин та передача вірусу, що проник у пошкоджені тканини здорових рослин.

Механічне перенесення за вегетативного способу розмноження також має значення для транспорту вірусів, що уражують рослини системно. Це відбувається при розмноженні рослин бульбами, живцями.

Передача інфекції насінням відбувається в тих випадках, коли вірус проникає в тканини насіння і сянці, вирощені з цих насінин, стають інфікованими. Інфікування насіння може відбуватися як за проникнення вірусу з вегетативних органів в генеративні, так і в процесі внесення його з пилком хворих рослин [75].

За векторного способу передачі вірусів у картоплярстві головну роль в природному розповсюдженні відіграють сисні комахи. Серед них найбільш поширеними векторами є попелиці. Їм властивий надзвичайно високий потенціал розмноження. Крім цього, популяції швидко відновлюють чисельність, навіть у випадках загибелі значної кількості особин [4].

Передача вірусів попелицями відбувається персистентно, напівперсистентно та непersistентно. За персистентної передачі вірус, потрапляючи в організм переносника, проходить певний інкубаційний період репродукування в ньому і зберігається в організмі переносника впродовж тривалого часу, а то і все життя.

Деякі віруси можуть передаватися комахами-переносниками напівперсистентно (в організмі переносника відбувається лише нагромадження вірусу). Вказані способи передачі є біологічними. За згаданого типу передачі інфекції вона може передаватися комахами і механічно. Це відбувається відразу або після короткотермінового живлення на хворій рослині, а потім на здоровій. Зазначене відбувається в тому випадку, коли вірус може передаватися із соком. У таких умовах важливою властивістю вірусів є здатність не втрачати інфекційності за високих ступенів розведення. Так, вірус УВК та вірус некрозу тютюну не втрачають своєї інфекційності при ступенях розведення 10^{-5} [110].

Вирощування на великих площах одного, основного виду рослин (зокрема картоплі) може призводити до розвитку дуже великої популяції комах-переносників і подальшого значного поширення захворювання. Ймовірність його збільшується за монокультури та інтродукції бур'янів-резерваторів вірусів.

Культурні посадки рослин являють собою "штучні суспільства", оскільки вони сформовані із дуже великої кількості рослин тільки одного виду, що знаходяться приблизно на однаковій стадії розвитку. Ця ситуація часто сприяє поширенню переносника і заодно вірусу. Агрофітоценози, що утворені хоча б двома, а бажано і більше видами культурних рослин, менш уражуються хворобами і шкідниками, зокрема, вірусами. Наприклад, віруси, що переносяться попелицями, майже не поширюються серед рослин картоплі, які виростили із минулорічних бульб в посівах зернових культур, оскільки ці рослини рідко заселяються переносниками вірусів картоплі [167].

Шеперс А. [172] встановив, що невеликі дослідні ділянки картоплі менш перезаражуються при сівбі між ними двох густих рядків вівса з міжряддями 15 см.

Найбільш дієвою стратегією заходів обмеження транспорту вірусної інфекції до рослин картоплі є знищення джерел вірусів та переносників. Ці заходи включають широкий діапазон таких агротехнічних прийомів: знищення бур'янів, особливо багаторічних, які є резерваторами багатьох вірусів; просторова та сезонна ізоляція від посівів інших культур, здатних уражуватися вірусами, небезпечними для картоплі. Сюди слід віднести і видалення залишків рослин з полів після збирання урожаю, заходи бережної роботи з рослинами (особливо в теплиці), що виключають перезараження рослин у випадках механічного контакту із зараженим інструментом, одягом.

Захист від переносників повинен проводитися як безпосередньо на плантаціях, так і поза ними прямими і непрямими методами, тобто з використанням інсектицидів, прийомів просторової ізоляції, кольорових пасток, загущених посівів, оптимальних строків садіння, що знижують заселеність посівів переносниками.

Зменшення кількості механічних обробітків за рахунок використання гербіцидів знижує інтенсивність зараження X, S, Y – вірусами картоплі в 2 - 2,5 рази, порівнюючи зі звичайними технологіями [200]. Однак, повністю унеможливити контакт рослин із машинами і знаряддями неможливо, тому необхідно вжити заходів для зменшення контактного переносу вірусної інфекції технікою.

Дієвим профілактичним заходом захистом від вірусів є сівозміна та просторова ізоляція. За вирощування картоплі монокультурою кількість інфікованих вірусами рослин, як порівняти із сівозміною, збільшувалася на 42,6% [18]. У зв'язку з цією закономірністю насінницькі розсадники також розміщують лише в полях сівозміни. Не можна насінневі посіви картоплі розміщувати поряд з іншими пасльоновими культурами, тому що вони сприяють зараженню спільними вірусами, зокрема Y вірусом картоплі. Відмічено, що посіви картоплі, розташовані поруч садів і овочевих культур, зазвичай, швидше уражуються зморшкуватою мозаїкою тому, що наявність плодкових насаджень, посівів овочевих культур сприяє масовому розмноженню попелиці, особливо, персикової, яка є активним переносником YВК, АВК та деяких інших.

Різні сорти по-різному уражуються вірусами. Поряд із індивідуальними особливостями сорту, відомо, що ранні сорти. Здебільшого сильніше піддаються ураженню вірусними хворобами. Чим ближче розміщені середньостиглі і пізні сорти до посівів ранніх сортів, тим раніше і сильніше вони уражуються фітофторозом та вірусними хворобами. Тому сорти різної стиглості необхідно розміщувати в різних полях.

Вище описане пов'язано з тим, що посіви картоплі по-різному заселяються попелицями та уражуються вірусами, залежно від віку рослин. Дослідження з впливу віку рослин сорту "Бінтє" на швидкість пересування YВК у бульби, показали, що чим старіші рослини в період їх зараження, тим більше часу потрібно для пересування його від місця інокуляції в бульби. Вікова стійкість починає проявлятися, хоча й не повністю, на початку періоду бульбоутворення. В тепличних дослідах вона реалізується майже повністю, за виключенням YВК^N, зазвичай через 2-3 тижні після того, як почалось бульбоутворення [18].

Найбільш практичний шлях використання вікової стійкості – якнайшвидше припинення росту листя та пагонів. На цій стадії відмічається висока ступінь вікової стійкості. Деякі агротехнічні заходи сприяють цьому. Однак, кліматичні фактори неможливо змінити. Щоб рослини досягли відповідної стадії розвитку в необхідний час, їх потрібно висаджувати раніше. Використання пророслих бульб сприяє ранньому розвитку рослин та вирівняності за висотою та розвитком насаджень.

Регулюючи мінеральне живлення можна суттєво впливати на розвиток рослин. Велика кількість азоту затримує розвиток, і тим самим настання вікової стійкості. Надлишок азоту сприяє росту картоплиння і уповільнює бульбоутворення. Пересування вірусу у рослинах картоплі під яку вносили високі дози азоту, пролонговано, бо вони більш тривалий час є віково молодими [4].

Тривалий ріст картоплиння стимулюють довгий світловий день, висока температура, низька інтенсивність світла, вологий багатий на азот ґрунт та фізіологічно молоді насінневі бульби. Протилежні умови сприяють швидшому росту бульб.

Як один із методів обмеження надходження вірусів у рослини картоплі застосовують раннє збирання урожаю. Вперше на раннє збирання картоплі, як спосіб захисту від з вірусних хвороб звернули увагу в країнах Західної Європи. Особливо широко його застосовують у Нідерландах. Нині існує кілька способів так званого голландського методу. У одних випадках проводять безпосереднє збирання картоплі у фазі цвітіння рослин або через 10-15 днів після цвітіння; в других – застосовують механічне скошування або хімічну обробку гербіцидами для раннього знищення картоплиння [172]. Слід відмітити, що хімічна десикація забезпечує отримання бажаного результату за умови повного знищення пагонів і не відростання нових. При цьому припиняється подальше проникнення вірусів із надземної частини в бульби. Самі ж бульби в обох випадках залишають в ґрунті на два-три тижні для їх дозрівання і, головним чином, для опробковіння шкірки, тому що в молодих бульбах вона слабо розвивається, і такі бульби погано зберігаються. Даний метод дозволяє уникнути лише екзогенну інфекцію поточного року [121, 157].

Серед попереджувальних заходів перспективними можуть бути регулярні обробки посівів мінеральними маслами (чистими або емульсованими у воді), що значно знижує заселеність переносниками, а, отже, й розповсюдження УВК. Проте, дуже часте обприскування зменшує урожай бульб [18, 110].

Основним способом захисту від вірусів є знищення переносників із застосуванням пестицидів. Це єдиний достатньо ефективний метод, що дозволяє швидко подолати спалахи їх розмноження. Ефективність хімічного захисту залежить від того, які форми попелиць (крилаті чи безкрилі) в поточному році і в конкретних умовах переносять вірусну інфекцію. Чим більша роль безкрилих форм в переносі інфекції і чим сильніша зараженість ділянки вірусними хворобами, тим ефективніше використання хімічних засобів захисту від попелиць і зниження ступеня ураження картоплі вірусними хворобами.

Слід враховувати, що проти сисних шкідників (попелиці, кліщі) ефективними є ті інсектициди, що адсорбуються рослиною і переміщуються в усі її органи. В умовах виробництва пестициди вносять шляхом обприскування листя. Обприскане листя утримує і адсорбує близько 30% препарату. Не менше 60% розчину часто не досягає цілі і потрапляє на поверхню ґрунту [75]. У зв'язку з такою низькою ефективністю процесу “доведення” пестицидів до шкідників, у ряді випадків набуває доцільність протруєння садивного матеріалу.

За хімічної обробки посівів частота пошкоджень залежатиме від активності популяції шкідників, що її заселяють. Із необробленої ділянки комахи можуть мігрувати на оброблену, але не повертатися. Різниця в заселеності ділянок може скорочуватися штучно, якщо, наприклад, пізніше оброблені, але краще розвинені рослини більшою мірою приваблюють мігруючих комах, ніж необроблені [4].

Для обмеження транспорту вірусів у рослини картоплі слід враховувати позитивний ефект так званої самоізоляції насаджень картоплі. Відомо, що крайні ряди ділянки відвідуються і заселяються попелицями більше, ніж її середина, тому рослини в середині ділянки менше піддаються зараженню афідофільними вірусами. Відповідно, чим більша площа ділянки, тим кращі умови створюються для зберігання матеріалу у здоровому стані. Тому рекомендують розмножувати здоровий матеріал картоплі у відкритому ґрунті, щоб площа складала не менше 1 га [75].

VIII. ПРОТОКОЛИ УДОСКОНАЛЕНИХ ТЕХНОЛОГІЙ МКРР ТА ПОСТАСЕПТИЧНОЇ АДАПТАЦІЇ

Вирощування ізольованих рослинних експлантів потребує чіткого дотримання технологічних прийомів. Усі вони за послідовністю виконання ділять на чотири групи:

- I. Добір материнських рослин, деконтамінація експлантів і первинне культивування;
- II. Розмноження *in vitro*;
- III. Укорінення *in vitro/ex vitro*;
- VI. Постасептична адаптація.

Нами наведено протоколи біотехнологій МКР наступних культур: хоста, туя західна, агапантус, малина, ожина, актинідія, картопля, алича, слива, персик.

8.1. Хоста

I. Добір рослин донорів експлантів. Найкращий період для ізоляції експлантів – це поява перших скручених в трубку листків в куцах, що вийшли із стану спокою. За візуальними ознаками, а за потреби й інструментальним аналізом, відбирають куці, вільні від вірусних хвороб. Відібрані рослини відмивають від субстрату та ізолюють бруньки.

Для стерилізації застосовують свіжий розчин гіпохлориту натрію (15-30 днів після розфасування на підприємстві виробника) і дистильованої автоклавованої води у співвідношенні 1:3. До отриманого розчину додають перманганат калію. Експозиція обробки експлантів – 20 хвилин. Потім стерильний рослинний матеріал двічі-тричі промивають в автоклавованому дистилаті до зникнення слідів забарвлення деконтамінуючої речовини. Після стерилізації та промивання експланти переносять в стерильні чашки Петрі. Видаляють відмерлі тканини або із слідами опіків, а бруньки висаджують на живильне модифіковане середовище Мурасіге і Скуга з додаванням 0,5 мг/л ІМК та 2,5 мг/л БАП (табл. 8.1).

Таблиця 8.1.

Живильне середовище для розмноження та вкорінення хости

Компонент середовища	Кількість мг/л		Компонент	Кількість мг/л	
	розмнож.	укорін.		розм.	укорін.
NH ₄ NO ₃	1250	1250	Na ₂ ЕДТАх2Н ₂ О	37,3	37,3
KNO ₃	1100	1100	Тіамін-НСІ	0,1	0,1
Ca(NO ₃) ₂ 4Н ₂ О	440	440	Піридоксин-НСІ	0,5	0,5
MgSO ₄ х7Н ₂ О	770	770	Вітамін С	1,6	1,6
КН ₂ РО ₄	970	970	Нікотинова кислота	1,0	1,0
Н ₃ ВО ₃	6,2	6,2	Мезоінозит	100	100
MnSO ₄ хН ₂ О	22,3	22,3	Гліцин	0,5	0,5
СоСІ ₂ х6Н ₂ О	0,025	0,025	ІМК	0,5	4,0
СuSO ₄ хН ₂ О	0,025	0,025	БАП	2,5	0,5
ZnSO ₄ х7Н ₂ О	8,6	8,6	Сахароза	30000	10000
Na ₂ МоО ₄ х2Н ₂ О	0,25	0,25	Агар	7000	7000
KJ	0,83	0,83	Активоване вугілля	-	4000
FeSO ₄ х7Н ₂ О	27,8	27,8			

У випадку прояву ознак ендофітного контамінування експланти повторно обробляють розчином гіпохлориту натрію та перманганату калію. Залежно від походження контамінуючої мікрофлори додають антибіотики або фунгіциди. Найчастіше на хості ендофітами є бактерії видів *Erwinia*, *Pseudomonas* та інші. У випадку такої контамінації в живильне середовище додають левоміцетин (діюча речовина хлорамфенікол) в кількості 250 мг/л та нітрат срібла в кількості 5 мг/л.

Якщо неможливо встановити тип забруднення або ж виявлено, що контамінування має грибне походження, перед стерилізацією гіпохлоритом натрію й перманганатом калію проводять замочування бруньок у розчині фунгіциду “Превікур Енерджи 840 SL”.

Для того, щоб краще проявлялися ознаки розвитку контамінантів в штучному живильному середовищі агар-агар замінюють на желатин в кількості 4-5 г/л. Цей гелеутворювач надає середовищу прозорої консистенції.

II. Розмноження, нарощування необхідної кількості рослинного матеріалу *in vitro*. Для розмноження хости використовують середовище із вмістом компонентів, наведених вище у таблиці 8.1. Для приготування середовища застосовують заздалегідь заготовлені маточні розчини (табл. 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6).

Таблиця 8.2.

Макросолі (розчиняти в літровій колбі), колба №1

№ п/п	Хімічна формула компонента	г на 1 л маточного розчину
1	NH_4NO_3	50,000
2	KNO_3	74,000
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30,800
4	KH_2PO_4	38,800

Таблиця 8.3.

Мікросолі (розчиняти в літровій колбі), колба №2

№ п/п	Хімічна формула компонента	г на 1 л маточного розчину
1	KJ	0,830
2	H_3BO_3	6,200
3	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,300
4	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600
5	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
6	$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,025
7	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025

Таблиця 8.4.

Fe-хелат (розчиняти в літровій колбі), колба №3

№ п/п	Хімічна формула компонента	г на 1 л маточного розчину
1	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,556
2	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,756

Приклад приготування 4 л живильного середовища для розмноження хости:

1. Підготувати посуд, у який буде розлито приготовлене середовище (пробірки, банки або контейнери).

2. Налити в колбу, а за її відсутності в емальовану каструлю, 3,0 літри дистилляту.

3. У цю ж колбу (каструлю) відважити 28 г агару та 120 г цукру.

Таблиця 8.5.

Кальцій* (розчиняти в літровій колбі), колба №4

№ п/п	Хімічна формула компонента	г на 1 л маточного розчину
1	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	44,000

*Примітка: готується окремо від макросолей, тому, що в маточних розчинах разом з ними випадає в осад

4. Каструлю з агаром, дистиллятом та цукром поставити на електроплиту і за малого нагрівання, не доводячи до кипіння, розплавити агар. Ознаками того, що агар, ще не розплавився є наявність крупинок агару на опущеній в розчин скляній паличці (пробірці). Якщо агар “переплавився” на поверхні розчину з’являтиметься піна. Цього не можна допускати оскільки таке середовище може не загуснути, тобто не утвориться однорідна гелеподібна маса.

5. Виставити маточні розчини на столі, згідно з таблицею 8.7.

6. Перевірити чи є всі маточні розчини.

7. Відсутні маточні розчини приготувати.

8. У літрову ємність (колбу) налити 250-300 мл дистилляту.

9. Згідно з таблицею 8.7., додати компоненти в цю літрову ємність.

10. Об’єм ємності (колби) дистиллятом довести до 1 л.

11. Довести рН до необхідного значення.

12. Після розчинення в каструлі агару й цукру додавати в неї суміш з літрової ємності.

13. Отримані 4 літри розлити в банки й проавтоклавувати (45 хв. з тиском 1,21 атм).

14. Приготовлене середовище за кімнатної температури впродовж години загусає. Нормальною вважається консистенція, коли колбу (пробірку або іншу культуральну ємність) із проавтоклавованим і загуслим середовищем переміщують на бік, і її вміст не розтікається. У випадку занадто загуслого середовища під час посадки живців відчувається його пружність. Живці повинні входити в середовище без зусиль.

Таблиця 8.6.

Маточні розчини біологічно активних речовин (розчиняти в окремих колбах), колба №5

№ п/п	Хімічна формула компонента	Кількість речовини, мг	Об’єм колби, мл
1	Вітамін В ₁ (тіамін)	250	250
2	Вітамін В ₆ (піридоксин)	250	250
3	Вітамін С (аскорбінова кислота)	250	250
4	Нікотинова кислота	250	250
5	Гліцин	50	50
6	Інозитол	2500	250
7	Аденін	250	250
8	Бензиламінопурін	250	250
9	Індолілмасляна кислота	250	250

Таблиця 8.7.

Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ у мл (варіант для розмноження)

№ п/п	Інградієнт середовища	На			Розведення в маточному розчині
		1 літр	2 літри	4 літри	
1	Макросолі	25	50	100	1:40
2	Мікросолі	1	2	4	1:1000
3	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	10	20	40	1:40
4	Fe-хелат	25	50	100	1:20
5	Вітамін В ₁ (тіамін)	1,6	3,2	6,4	1:1*
	Вітамін В ₆	1,0	2,0	4,0	1:1
6	Вітамін С (аскорбінова кислота)	3,0	6,0	12,0	1:1
7	Нікотинова кислота	1,0	2,0	4,0	1:1
8	Гліцин	0,5	1,0	2,0	1:1
9	Інозитол	10	20	40	1:10
10	Аденін	5	10	40	1:1
11	Бензиламінопурин	2,5	5,0	10	1:1
12	Індолілмасляна кислота	0,5	1,0	2,0	1:1

*Примітка: один міліграм в одному мілілітрі

Живцювання проводять одних із двох способів (рис. 8.1):

- поділом стебла;
- поділом куща на окремі пагони.

За першого способу живцювання повторне субкультивування проводять через 25-35 днів, а за другого – через 45-60 днів, збільшуючи при цьому вміст сахарози до 40 г/л. Перший спосіб передбачає розділення на сегменти наземної частини пагона. Залежно від товщини пагона, його можна поділити на 2-4 частини. Зняте таким чином апікальне домінування обумовлює пробудження значної кількості бічних бруньок. Цей спосіб доцільніший за потреби швидкого нарощування кількості рослин в асептичних умовах. Для стимуляції в потомстві ризогенезу останній пасаж перед вкоріненням краще проводити другим методом – поділом куща на мікропагони. Окремі пагони мають добре розвинені апікальні бруньки, які є джерелами ендогенних ауксинів, що значно покращує утворення кореневої системи у розсади ще в асептичних умовах.

Під час поділу рослин на сегменти (живці) важливо уникати травмування бруньок, тобто рух ланцета має бути між бруньками, як це зображено на рисунку 8.2. Травмовані бруньки можуть бути джерелами калюсоутворення, а, як відомо, калюсогенез є джерелом соматичної мінливості. У випадку, коли травмовані бруньки розвиватимуться шляхом прямого морфогенезу, вони відстають у рості, а це за нашими спостереженнями, зумовлює асинхронність розвитку регенерантів.

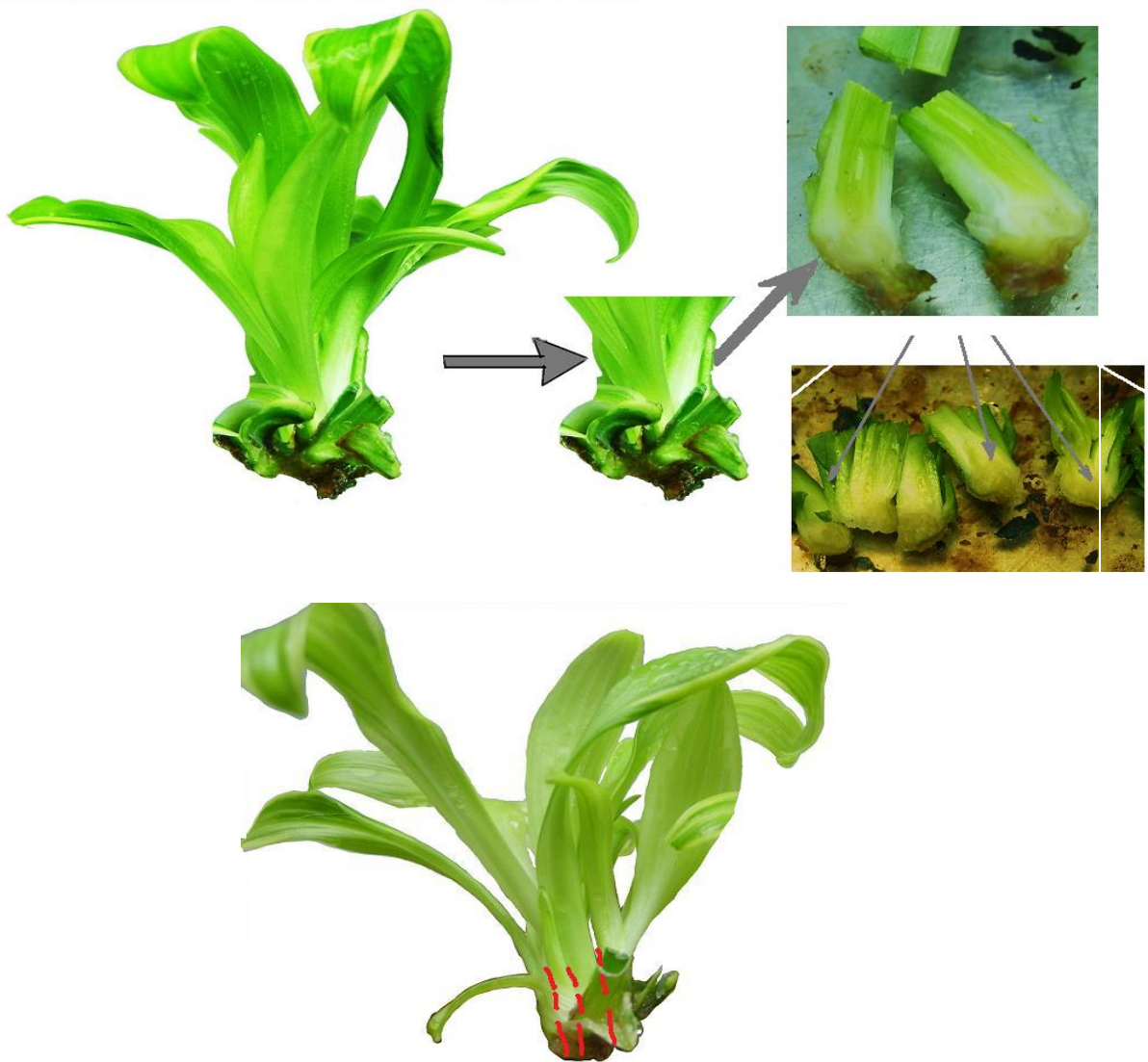


Рис. 8.1. Способи живцювання хости: поділом стебла (вверху); поділом куща на окремі пагони (внизу).

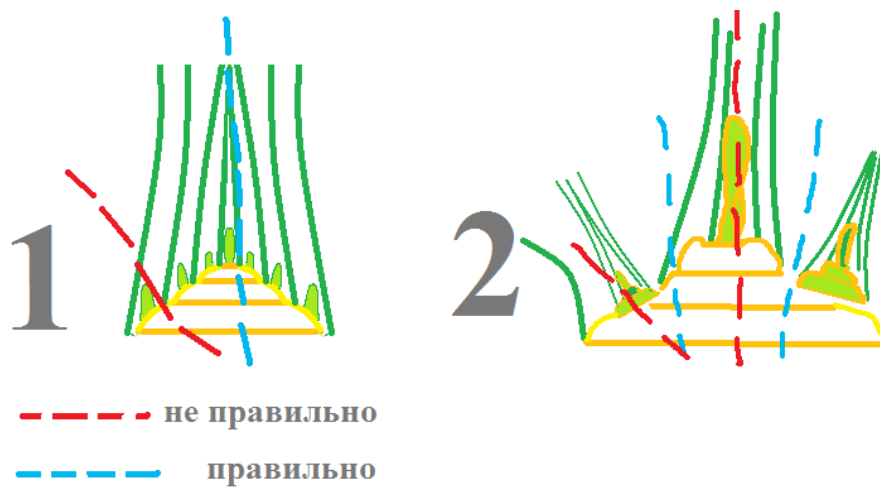


Рис. 8.2. Рух ланцета під час поділу рослин хости: 1. поділом стебла; 2. поділом куща на окремі пагони.

III. Укорінення проводять *in vitro*. Для цього змінюють уміст гормонів: зменшують концентрацію БАП з 2,5 мг/л до 0,5 мг/л та збільшують уміст ІМК кислоти з 0,5 мг/л до 3,0-4,0 мг/л. Також додають активоване вугілля та зменшують уміст сахарози до 10 г/л. Якщо через тривале культивування (більше 45-60 днів) є загроза переростання розсади, уміст мінеральної частини зменшують вдвічі.

IV. Постасептичну адаптацію проводять у парниках за умов вологої камери. Для збереження рослин від сонячних опіків та втрат вологи розсаду перші два тижні постасептичного культивування вкривають агроволокном.

Як субстрат використовують торф із рН близьким до 6,0. У перший період після садіння слідкують за появою мікрофлори, яка знищує ніжні рослини. Як захід запобігання її поширення – розсаду обробляють фунгіцидами. За 2-3 три місяці розсада формує 7-10 листків і стає придатною до висадки у відкритий ґрунт (рис. 8.3).



Рис. 8.3. Рослини хости після постасептичної адаптації

8.2. Агапантус

I. Як донори первинних експлантів краще використовувати рослини сіянці що дозволяє зменшити ендофітне контамінування. Однак, це є ризикованим з точки зору втрати генетичної константності сорту. А тому зазвичай первинними експлантами є бутони, які не розкрилися. З них ізолюють основи суцвіть та нерозкриті квітки.

Деконтамінуючими речовинами доцільно застосовувати розчин гіпхлориту натрію та перманганату калію. Перед застосуванням їх експланти витримують у розчині фунгіцидів (“Превікур Енерджи 840 SL”, в.р.к. – “Bayer Garden” або “Максим Форте 050 FS” т.к.с. – “Syngenta”). За появи ознак бактеріального контамінування рослини повторно обробляють розчином антисептиків, а в живильне середовище додають антибіотики левоміцитин (*Chloramphenicol*) або Гентаміцину сульфат і (або) нітрат срібла. Експланти на такому середовищі культивують не більше двох-трьох тижнів, оскільки вказані контамінанти пригнічують їх розвиток.

За проліферації експлантами первинних листків (рис. 8.4.) їх пересаджують на свіже живильне середовище. До утворення повноцінних регенерантів пересадки проводять із проміжками не більшими, ніж три тижні. Це пов'язано з тим, що поверхневі тканини відразу відмирають, погіршуючи, у такий спосіб контакт із середовищем.

II. Для розмноження використовують куці, які можна ділити на окремі пагони. Недопустимим є розділення пагона на шматки вздовж стебла. Натомість необхідно проводити поділ так, щоб вберегти від травмування точки росту (рис. 8.5).

Для розмноження застосовують живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга із додаванням 1,5 мг/л БАП та 0,3 мг/л ІМК. Повторне субкультивування проводять через 80-90 днів.

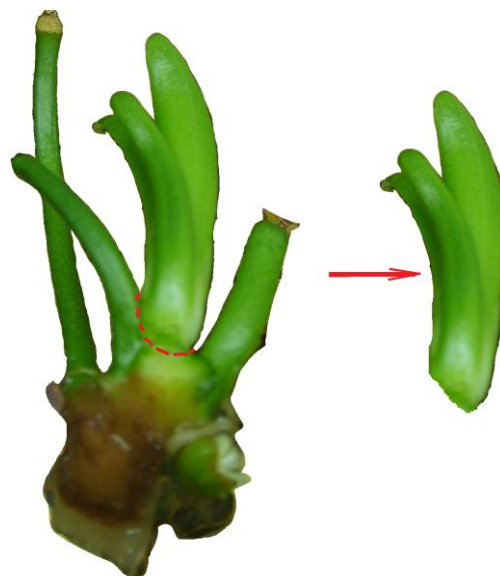


Рис. 8.4. Відокремлення мікропагонів від первинних експлантів



Рис. 8.5. Поділ конгломерату на пагони

III. Отриманні під час поділу конгломератів пагони висаджують для вкорінення на живильне середовище Мурасіге і Скуга із додаванням активованого вугілля. Кількість ІМК збільшують до 2 мг/л, натомість вміст БАП зменшують до 0,1 мг/л. Для сортів, які важко вкорінюються, проводять проміжне культивування на безгормональному середовищі.

Після цього їх ділять на мікропагони, які висаджують на середовище із підвищеним умістом ауксинів.

IV. Укорінення проводять в парниках на субстраті, що складається із торфу та перліту (3:1). Кислотність субстрату повинна бути близькою до нейтральної.

8.3. Туя західна

I. Вибір рослини-донора. Ізоляція і стерилізація експлантів, створення умов для їх росту на живильному середовищі.

Первинний експлант. Залежно від можливості розчеплення корисних ознак у потомстві для МКР туї західної використовують меристеми або проростки насіння.

Методика стерилізації:

- обробка розчином фунгіциду – 20 хв;
- промивання у стерильній воді;
- обробка 70 %-ним розчином етанолу – 5 с;
- обробка 20 % розчином гіпохлориту натрію, або 0,07% розчином препарату “Бланідас 300”;
- 3–4-кратне промивання у стерильній воді.

II. Умови культивування. Середовище Мурасіге і Скуга, що містить 30 г/л сахарози, 7 г/л агару, 1 мг/л ІОК, 20,0 мг/л аденіну, 15 мг/л вітаміну С. Температура – 21–23 °С. Освітленість – 1800 лк. Фотоперіод – 16 годин. Для тривалого субкультивування проводять відбір експлантів з ювенільною хвоєю.

III. Вторинний експлант: мікропагони висотою менше 3-4 см, що мають 2–3 міжвузля.

Укорінення розмножених пагонів проводиться на рідкому живильному середовищі Мурасіге і Скуга, що містить 30 г/л сахарози, 2 мг/л ІОК кислоти, 20,0 мг/л аденіну, 15 мг/л вітаміну С. Температура – 21–23 °С. Освітленість – 1800 лк. Фотоперіод – 16 годин

IV. Адаптація рослин-регенерантів до умов *in vivo*. Мікропарники (вологі камери) з автоклавованим субстратом в умовах підвищеної вологості та освітленості. Склад субстрату: суміш перліту та моху сфагнуму (1:1). Перші два тижні волога камера, а потім вологість поступово впродовж місяця знижують. Після цього адаптовані рослини переносять у відкритий ґрунт.

8.4. Картопля

Основою насінництва картоплі є біотехнологічні методи, що передбачать оздоровлення та прискорене розмноження тестованого безвірусного матеріалу. У технології оздоровлення сортів картоплі виділяють такі етапи: добір материнських рослин в полі (клонів) – термотерапія бульб – виділення меристеми – регенерація рослин із меристем – МКРР *in vitro* – вирощування рослин у культивувальних спорудах та в полі.

I. Добір материнських рослин, деконтамінація експлантів і первинне культивування. На цьому етапі застосовують наступні прийоми: добір кращих кущів, термо- або хеміотерапія, ізоляція та культивування меристем.

Відбори бульб проводять за основними сортовими морфологічними ознаками та тестують на наявність латентної вірусної інфекції.

Термотерапія бульб. Для термотерапії відбирають бульби, які пройшли період спокою, типові для сорту, що не мають поверхневих ушкоджень та грибною інфекції. Бульби ретельно миють і розміщують у кюветах, наповнених піском. Вони піддаються термотерапії у затемненому термобоксі і автоматично регульованій температурі в межах 37–39 °С. Вологість повітря підтримують не нижче 75 %, світло в боксі включають лише під час догляду за бульбами. У цих умовах на бульбах утворюються довгі етіольовані паростки. Тривалість та параметри режиму термотерапії визначаються як видовим складом вірусів, так і біологією сорту. Зазвичай вона триває від 2 до 12 тижнів.

Виділення меристем. Для виділення меристем використовують зрізані верхівки паростків (довжиною 2–3 см) із бульб, що пройшли термотерапію. Їх стерилізують у розчині діюциду або гіпохлориту натрію. Для цього паростки опускають у розчин на 3–5 хв., потім тричі промивають стерильним бідистиліатом.

Ізолюють меристеми від паростків під біокулярним стереомікроскопом з масштабною сіткою та збільшенням не менше ніж 24 рази. Для виділення меристем використовують добре загострені великі медичні голки (діаметром близько 2 мм і довжиною 10–15 см).

Паросток підносять до столика мікроскопа, затиснувши пальцями або стерильним пінцетом, відламують покривні листки верхівки бруньки. Останні 3–4 зачаткові листки відламують під мікроскопом за допомогою ін'єкційних медичних голок, звільняючи меристему від покривів. Меристему розміром 100–200 мк з одним примордіальним листком відокремлюють двостороннім підрізанням голкою і на її вістрі переносять на агаризоване живильне середовище в пробірці, уколом голки в агар та плавним розрізуванням голкою агару на $\frac{1}{2}$ діаметра пробірки (рухом від центру до стінки) залишають меристему в пробірці.

Потім пробірки ставлять у спеціальні камери із регульованим світловим та волого-температурним режимом. Температура культивування меристем становить 24–25 °С, освітленість 4–12 тис. люкс з 16-годинним фотоперіодом. Регенерація з меристем рослин *in vitro* становить 2–8 місяців. Впродовж цього періоду меристемні експланти через кожні 10–15 днів пересаджують на нове середовище. При цьому залежно від стану експлантів кількісно і якісно змінюють уміст таких гормонів: ІОК, кінетин та гіберелін.

Отримані рослини розмножують і одночасно трикратно перевіряють на зараженість вірусами, застосовуючи метод імуноферментного аналізу та полімеразно-ланцюгову реакцію.

II. Прискорене розмноження *in vitro*. Залежно від потреб виробництва в асептичних умовах отримують розсаду або мікробульби. Для нарощування необхідної кількості матеріалу проводять живцювання. Рослини в асептичних умовах бокса виймають із пробірок, розрізають на частини, кожна з яких повинна містити відрізок стебла з листком та пазуховою брунькою (рис. 8.6). Частина стебла над листком має бути в 2–3 рази коротша частини стебла розміщеної нижче листка. Живці висаджують на живильне середовище, розроблене в Інституті картоплярства НААНУ.

Склад середовища (в мг на 1л) такий: макросолі: $\text{-NH}_4\text{NO}_3$ – 1250; KNO_3 – 1100; $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 440; KH_2PO_4 – 970; мікросолі за прописом Мурасіге і Скуга, однак кількість $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ збільшено до 770 мг/л. Органічні добавки: B_6 – 3,0, B_1 – 1,6, аскорбінова кислота – 1,6; кінетин – 0,25; аденін – 0,25; ІОК – 1,0; агар – 700, сахароза – 1000. Кожне подальше живцювання рослин проводять через 30 днів.

Живці садять у пробірки із живильним середовищем на глибину міжвузля. Через 18-22 дні рослини відростають, їх використовують для повторного живцювання до одержання необхідної кількості рослин, які використовують для одержання мікро-, мінібульб і розсади. Використання методу живцювання рослин у пробірках дозволяє впродовж 3-4-х місяців отримати 2-3 тис. рослин, придатних для пересадки в ґрунт. Тобто за 8-10 місяців коефіцієнт розмноження однієї рослини становить близько 20 тис.

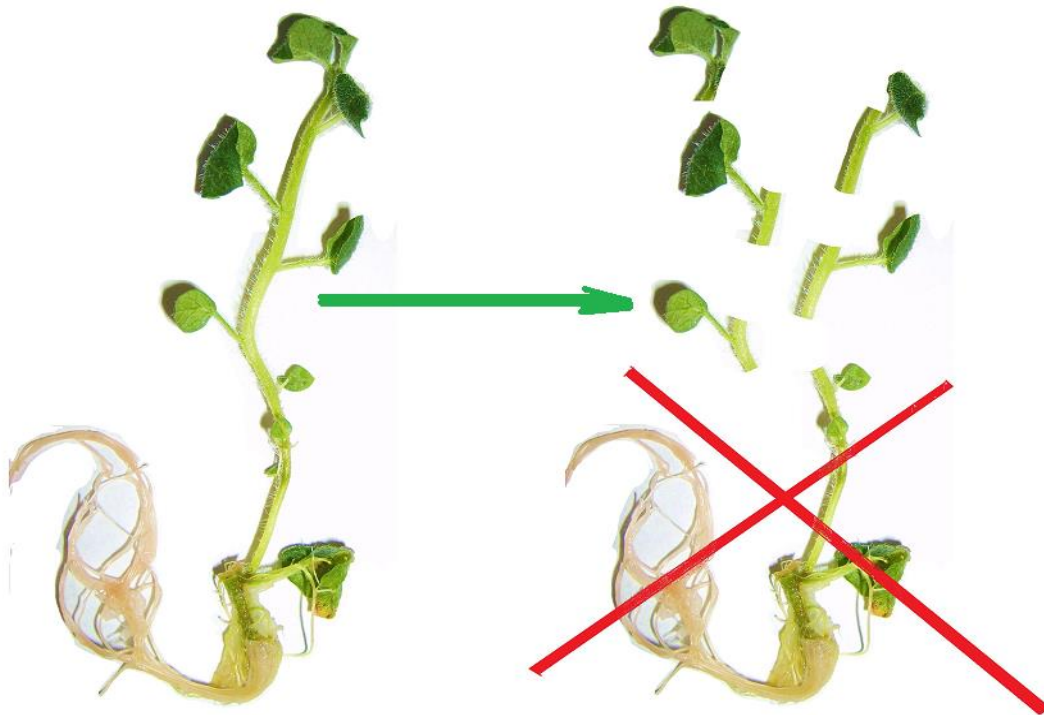


Рис. 8.6. Поділ рослин картоплі на живці

Для отримання мікробульб у пробірках використовують живильні середовища з високим рівнем мінерального та вуглеводного живлення і регульований фоторежим. Важливим фактором столоно- і бульбоутворення є підвищена концентрація сахарози в середовищі (4-8%) та 16 годинний фотоперіод впродовж перших 10-15 діб, а потім 35-45 діб короткоденний 4-10 годинний фотоперіод. Більшість сортів утворюють бульби в пробірках за 55-60 діб.

Вирощування темнових мікробульб методом культури одного вузла. Регулювання температури культивування в пробірковій культурі, дозволяє, впливати на особливості реалізації генетичної програми, властивої певному виду рослин. За температури 18–26 °С із бруньки живця розвиваються пагони і лише через 30–50 діб починається столоно- та бульбоутворення, а за температури культивування 12–16 °С із бруньки живця відразу утворюється столон та бульба.

Характерно, що короткотривале витримування живців впродовж 1–2 діб при низьких позитивних температурах (преінкубація) з подальшим температурним режимом 18–26 °С, сприяє аналогічному розвитку живців, як і за постійної температури культивування 12–16 °С Застосування цього методу дозволяє зменшити затрати на електроенергію та амортизацію обладнання, оскільки освітлювальний період скорочується до 7 днів в ранньостиглих та до 10 днів середньостиглих сортів.

Перед висадкою зібрані “темнові мікробульби” витримують впродовж тижня на розсіяному світлі.

В асептичних умовах раціональними є наступні модифікації живильного середовища:

- заміна кінетину на 20 мг/л аденіну або за умови занесення до “списку дозволених до використання...” препарату Д-9;
- заміна агару на крохмаль (5 г/л).

Виробництво розсади для одержання мінібульб. Розсаду одержують як дорощуванням рослин *in vitro*, так і живцюванням їх *in vivo* на субстратах у вологих камерах та укоріненням верхівок і пазухових пагонів, або за допомогою інших методів. Як субстрати після встановлення рН на рівні 6,0 використовують перліт, мох сфагнум, гідрогелі, пластагар. Джерело елементів живлення – розчин мінеральних солей за приписом Мурасіге і Скуга.

8.5. Малина

I. Добір рослин донорів експлантів. Найкращий період для ізоляції експлантів – це пробудження бруньок. За візуальними ознаками, а за потреби інструментальним аналізом, відбирають куці, вільні від вірусних хвороб. Відібрані рослини відмивають від субстрату, ізолюють шматки пагонів із бруньками та занурюють в розчин (1 – 2,0 мл на 100 мл дистилляту) системного фунгіциду “Превікур Енерджи 840 SL”. Після замочування в фунгіциді об’єкти промивають автоклавованим дистиллятом. Для подальшої стерилізації застосовують свіжий розчин гіпохлориту натрію і дистильованої автоклавованої води в співвідношенні один до трьох. Експозиція обробки експлантів становить 20 хвилин. Потім стерильний рослинний матеріал двічі-тричі промивають в автоклавованому дистилляті до зникнення слідів деконтамінуючого розчину. Після стерилізації та промивання експланти переносять в стерильні чашки Петрі. Видаляють відмерлі або із слідами опіків тканин. Бруньки або меристеми висаджують на поживне модифіковане середовище (табл. 8.8.) з додаванням 2-2,5 мл/л РРМ.

Таблиця 8.8.

Живильне середовище для розмноження та вкорінення малини

Компонент	Кількість мг/л		Компонент	Кількість мг/л	
	розмнож.	укор.		розмнож.	укор.
NH ₄ NO ₃	1250	625	FeSO ₄ ·7H ₂ O	55,6	55,6
KNO ₃	1100	550	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	74,6	74,6
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	440	220	Тіамін-НСl	1,6	1,6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	770	385	Піридоксин-НСl	0,5	0,5
KH ₂ PO ₄	970	485	Вітамін С	6,0	6,0
H ₃ BO ₃	6,2	3,6	Нікотинова кислота	1,0	1,0
MnSO ₄ ·H ₂ O	22,3	11,15	Мезоінозит	100	100
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0125	Гліцин	0,5	0,5
CuSO ₄ ·H ₂ O	0,025	0,0125	Аденін	0,2	0,1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	4,3	ІМК	0,1	2,0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,125	Бензиламінопурин	1,5	0,1
KJ	0,83	0,415	Сахароза	30000	10000
			Агар	7000	7000
рН 5,6					

Відмінністю середовища для малини є високий уміст антиоксиданту (аскорбінова кислота), речовин з цитокініновою активністю (бензиламінопурину і аденіну) та заліза.

У випадку застосування замість $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ препарату Ferrilene 4.8 Orto – Orto на 1 літр його додають 183,4 мг/л.

Для деконтамінації в живильне середовище додають 2,5 мл/л біоциду PPM, а вміст агару зменшують до 6,5 г/л. Експланти повністю занурюють в живильне середовище. Це робиться для кращого контакту рослинних тканин із PPM. Через 2-3 тижні деконтаміновані об'єкти висаджують в живильне середовище, але щоб брунька знаходилася на поверхні середовища.

II. Розмноження, нарощування необхідної кількості рослинного матеріалу *in vitro*. Для розмноження використовують середовище із вмістом компонентів, представлених в таблиці 8.9. Його готують із маточних розчинів аналогічно протоколам по хості.

Живцювання проводять шляхом поділу конгломерату пагонів (рис. 8.7.). Для отримання конгломератів вміст БАП збільшують, а для отримання регенерантів із одним пагоном - зменшують.

Таблиця 8.9.

Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ в мл (варіант для розмноження)

№ п/п	Інгредієнт середовища	мл		
		1 літр	3 літри	6 літрів
1	Макросолі	25	75	150
2	Мікросолі	1	3	6
3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10	30	60
4	Fe-хелат або Ferrilene 4.8 Orto – Orto	50	150	300
5	Вітамін В ₁ (тіамін)	1,6	3,2	9,6
6	Вітамін В ₆ (піридоксин)	1,0	3,0	6,0
7	Вітамін С (аскорбінова кислота)	6,0	18,0	36,0
8	Нікотинова кислота	1,0	3,0	6,0
9	Гліцин	0,5	1,5	3,0
10	Інозитол	10	30	60
11	Аденін (1:1)	2,0	6,0	12,0
12	Бензиламінопурин (1:1)	1,5	4,5	9,0
13	Індолілмасляна кислота (1: 1)	0,1	0,3	0,6

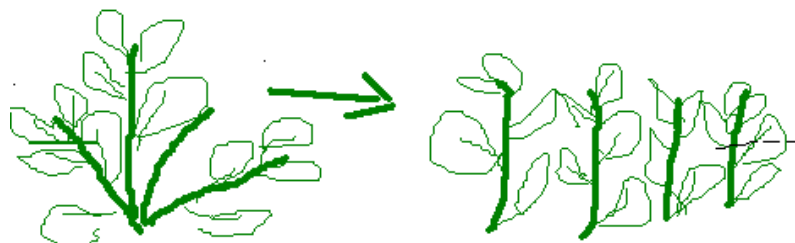


Рис. 8.7. Спосіб живцювання малини *in vitro*

Укорінення. Проводять *in vitro*. Для цього змінюють середовище (табл. 8.10). Зменшується уміст мінеральної частини та цитокінінів.

Таблиця 8.10.

Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ в мл
(варіант для укорінення)

№ п/п	Інградієнт середовища (маточний розчин)	мл		
		1 літр	3 літри	6 літрів
1	Макросолі	12,5	37,5	75
2	Мікросолі	0,5	1,5	3
3	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	5	15	30
4	Fe-хелат або <i>Ferrilene 4.8 Orto-Orto</i>	50	150	300
5	Вітамін В ₁ (тіамін)	1,6	3,2	9,6
6	Вітамін В ₆ (піридоксин)	1,0	3,0	6,0
7	Вітамін С (аскорбінова кислота)	6,0	18,0	36,0
8	Нікотинова кислота	1,0	3,0	6,0
9	Гліцин	0,5	1,5	3,0
10	Інозитол	10	30	60
11	Аденін (1:1)	0,5	1,5	3,0
12	Бензиламінопурін (1:1)	1,0	3,0	6,0
13	Індолілмасляна кислота (1: 1)	2,0	6,0	12,0

IV. Постасептична адаптація регенерантів віком не менше 35-45 днів проходить в парниках за умов вологої камери із туманоутворювачем. Для збереження рослин від сонячних опіків та втрат вологи касети із розсадою перші два тижні постасептичного культивування висаджують в прозорі контейнери, кришки яких поступово відкривають.

В якості субстрату використовують перліт, преліт-вермикулітну суміш або торф із рН близькою до 6,0. У перші періоди слідкують за появою мікрофлори, яка знищує ніжні рослини. За перших ознак інфікування грибною інфекцією розсаду обробляють фунгіцидами (“Превікур Енерджи840 SL”). За 1,5 місяці розсада формує 5-7 листків і стає придатною до висадки в відкритий ґрунт (рис. 8.8.). Завдяки ювенілізації *in vitro* адаптовані регенеранти здатні до 1-2 живцювань, але вже в умовах закритого ґрунту. Це дозволяє знизити собівартість посадкового матеріалу.



Рис. 8.8а. Малина *ex vitro* після 30 днів адаптації



Після 45 днів адаптації



Регенерант після постасептичного живцювання

Рис. 8.8б. Адаптовані регенеранти малини, сорт Брусвяна

8.6.Ожина

I. Добір рослин донорів експлантів та введення в асептичні умови проводять аналогічно малині (див. попередній підрозділ 8.5. Малина).

II. Розмноження, нарощування необхідної кількості рослинного матеріалу *in vitro*. Для розмноження використовують середовище із вмістом компонентів, представлених в таблиці 8.11.

Під час приготування середовища застосовують заздалегідь приготовлені маточні розчини аналогічно описаним в протоколі для хости (підрозділ 8.1.). Проте у випадку використання Ferrilene 4.8 Orto–Orto замість Fe-хелату беруть 91,7 мг цієї речовини. В середовище додають маточні розчини, згідно таблиці 8.12.

Таблиця 8.11.

Живильне середовище для розмноження та вкорінення ожини

Компонент	Кількість мг/л		Компонент	Кількість мг/л	
	розмнож.	укоп.		розмнож.	укоп.
NH ₄ NO ₃	1250	1250	Ferrilene 4.8 Orto–Orto	137,55	-
KNO ₃	1100	1100	AgNO ₃	1,0	1,0
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	440	440	Тіамін-НСl	1,0	1,0
MgSO ₄ x7H ₂ O	770	770	Піридоксин-НСl	0,5	0,5
KH ₂ PO ₄	970	970	Вітамін С	1,6	1,6
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	Нікотинова кислота	1,0	1,0
MnSO ₄ xH ₂ O	22,3	22,3	Мезоінозит	100	100
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025	0,025	Гліцин	0,5	0,5
CuSO ₄ xH ₂ O	0,025	0,025	Аденін	0,2	0,1
ZnSO ₄ x7H ₂ O	8,6	8,6	ІМК	0,1	4,0
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,25	0,25	Бензиламінопурин	0,5	0,2
KJ	0,83	0,83	Сахароза	30000	10000
FeSO ₄ x7H ₂ O	-	27,8	Агар	7000	7000
Na ₂ ЕДТАx2H ₂ O	-	37,3	*Активоване вугілля	1000	1000
рН 5,6					

* в випадку «введення» а. вугілля не додається

Таблиця 8.12.

Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ в мл (варіант для розмноження)

№ п/п	Інградієнт середовища	мл		
		1 літр	3 літри	6 літрів
1	Макросолі	25	75	150
2	Мікросолі	1	3	6
3	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	10	30	60
4	Fe-хелат, або Ferrilene 4.8 Orto–Orto	35	105	210
5	Вітамін В ₁ (тіамін)	1,6	3,2	9,6
6	Вітамін В ₆ (піридоксин)	1,0	3,0	6,0
7	Вітамін С (аскорбінова кислота)	3,0	9,0	18,0
8	Нікотинова кислота	1,0	3,0	6,0
9	Гліцин	0,5	1,5	3,0
10	Інозитол	10	30	60
11	Аденін (1:1)	1	3	6
12	Бензиламінопурин (1:1)	0,5	1,5	3,0
13	Індолілмасляна кислота (1: 1)	1	3	6
14	Нітрат срібла	1,5	4,5	9,0
15	Активоване вугілля, г	1,0	3,0	6,0

Живцювання проводять одним із двох способів: 1) поділом стебла на одно-двовузлові живці; 2) поділом конгломерату пагонів. Для отримання конгломератів вміст БАП збільшують, а для отримання регенерантів із одним пагоном - зменшують.

III. Укорінення. Проводять *in vitro*. Для цього змінюють вміст гормонів: зменшують вміст бензиламінопурину із 0,5 мг/л до 0,1 мг/л та збільшують вміст індолілмасляної кислоти із 0,1 мг/л до 1,0-2,0 мг/л. Якщо є загроза через тривалий період культивування (більше 45-60 днів) переростання розсади більше розмірів культуральних ємностей, вміст мінеральної частини (окрім хелату заліза, його вміст залишається без змін) зменшують вдвічі.

IV. Постасептичну адаптацію проводять в два етапи:

1. Способом фотоавтотрофного мікроклонального розмноження. Для цього вихідні материнські рослини живцюють на перліт-вермикулітний субстрат. Живлення забезпечують розчином мінеральних речовин за Мурасіге-Скугом. Боротьбу з бактеріями проводять додаванням нітратного срібла в розчин, а з грибами обприскуванням раз в п'ять днів розчином фунгіциду Превікур Енерджі.

2. Після культивування фотоавтотрофним способом подальшу адаптацію проводять у парниках за умов вологої камери. Для збереження рослин від сонячних опіків та втрат вологи розсаду перші два тижні постасептичного культивування вкривають агроволокном.

У якості субстрату використовують субстрат Laflora KKS-1 на основі фрезерного торфу із рН близькою до 6,0. У перші періоди слідкують за появою мікрофлори яка знищує ніжні рослини. При появі перших ознак розсаду обробляють фунгіцидами. За 2-3 три місяці розсада формує 5-7 листків і стає придатна до висадки у відкритий ґрунт або горщики об'ємом 0,8-2 літри (рис. 8.9.).



Рис. 8.9. Адаптовані регенеранти ожини в Р9

8.7. Актинідія

Відомо близько 30 видів (за <https://uk.wikipedia.org/wiki/Актинідія>) актинідії. Цей протокол розроблено і успішно апробовано на таких видах: А. аргута, А. коломікта, А. китайська (рис. 8.10) та А. делікатесна (ківі).

Добір материнських рослин, деконтамінація експлантів і первинне культивування. Нами розроблено і рекомендується для практичного застосування підготовчий етап вирощування маточних 1-2 річних рослин в умовах закритого ґрунту депозитарію. Їх вирощують за умови розсіяного світла, без природнього ультрафіолетового опромінення та з інтенсивним хімічним захистом від потенційних контамінантів. Це переважно сапрофітна непатогенна мікрофлора, що в майбутньому може потрапити з

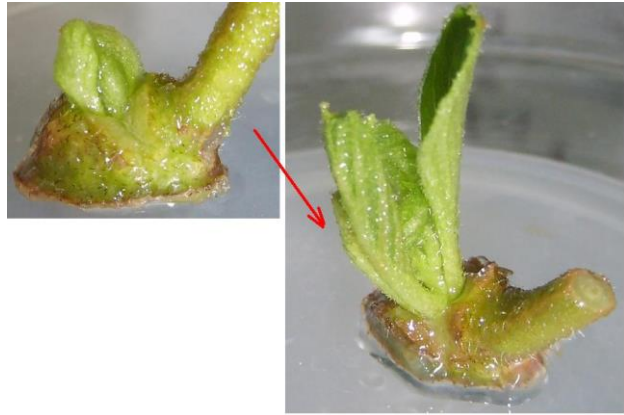


Рис. 8.10. Регенерація бруньки *Actinidia chinensis*

з рослинним матеріалом в живильне середовище. Первинна обробка, особливі умови вирощування в депозитарії зменшує забруднення первинних експлантів та зменшує виділення ними в живильне середовище фенолоподібного ексудату.

В якості експлантів використовують бруньки, що відновили ріст. Ізоляцію проводили так, щоб біля бруньки залишалася невелика, розміром в 0,2-0,5 мм п'ятка. Перед деконтамінацію ізольовані первинні матеріал замочують в антиоксидантому розчині (перші 60 хв - аскорбінова кислота 200 мг/л + цистеїн 5 мг/л; наступні 60 хв 10 г/л полівінілпіролідон).

Потім для боротьби із глибинним контамінуванням бруньки перенести в розчин системного фунгіцида "Превікур Енерджи 840 SL". Після усіх цих попередніх



Рис. 8.11. Гормональна детермінація онтогенезу рослин *A. arguta in vitro*, сорт Оригінальна, 30-й день асептичного культивування:

1. БАП - 1,5 мг/л; 2. ІМК - 2 мг/л.

обробляють згідно вказаній схемі. В живильне середовище додають біоцид 2 мл/л РРМ™ (Plant Preservative Mixture). Оскільки РРМ має контактну дію, то рослинний матеріал на 2-3 тижні занурюють повністю

обробок застосовують 20 хвилинну обробку розчином натрієвої солі дихлорціануронової кислоти (0,7 г препарату Бланідас 300 на 100 мл автоклавованого дистилляту). Промивання матеріалу проводять тричі в автоклавовану дистилляті. Бруньки звільняють від верхніх листків. Їх висаджують на живильне середовище аналогічне, представленому протоколу по МКРР малини.

У випадку рецидивів інфекції експланти повторно

Розмноження та ризогенез *in vitro*. Для культивування використовують живильні середовища аналогічно протоколу по малині. Для розмноження використовують варіант середовища із надлишком БАП (рис. 8.11.), а для індукції ризогенезу – надлишок ауксину (ІМК). Також для ризогенезу можна застосовувати середовище Куаріна і Лепувра з половинним вмістом мінеральних елементів та додаванням ауксину ІМК. Поділ 30 денних маточних рослин на живці проводять шляхом розділення конгломерату пагонів, більші пагони ділять на одно-двовузлові живці.

Постасептична адаптація. Основними вимогами до постасептичної адаптації актинідії є підтримання рівня рН (5,5) субстрату та вологості (рис. 8.12). Готують субстрат на основі верхового торфу. До його додають мінеральну частину середовища, що застосовувалося *in vitro*.



рН субстрату 6,5; Вологість 75%

рН субстрату 5,5; Вологість 100%

Рис. 8.12. Вплив вологості повітря та кислотності субстрату на особливості постасептичної адаптації актинідії аргути.



Рис. 8.13. Відновлення рослин актинідії аргути після низької вологості

Низька вологість і особливо в поєднанні із високим рН викликає фізіологічні опіки рослин які можна прийняти за ураження грибною інфекцією. Якщо за низької вологості збереглися бруньки то при підвищенні вологості до 100% регенеранти відновлюються (рис. 8.13). За два-три тижні після висадки вологість поступово знижують, і через місяць рослини стають готовими до реалізації або пересаджування в більшій ємності (рис. 8.14).



Рис. 8.14. Адаптовані протягом одного місяця рослини актинідії аргута

8.5. Алича, слива, персик, підщепи персика

Цей протокол успішно застосовується на підщепках “Міраболано 29С”, “GF-677” (рис. 8.16), “Спутнік”, персиках (“Пам'яті Гришка”, “Щедрий”, та ін.), сливі (“Трудіниця Млієва”).



підщепа “GF-677”



персик, сорт “Пам'яті Гришка”

Рис. 8.16. Ріст регенерантів на модифікованому середовищі

I. Добір рослин-донорів експлантів. За наявності придбаних в спеціалізованих лабораторіях сертифікованих безвірусних рослини *in vitro* «класу М0» потреби в цьому етапі не має. Однак якщо є необхідність отримати вихідний асептичний матеріал, у період відновлення вегетації ізолюють первинні експланти. Найкращий період для цього – пробудження бруньок: «зелений конус, поява кінчиків перших листків». Це переважно пробуджені бруньки, із яких почали з'являтися молоді листки. З бруньок знімають криючі луски, оскільки в них знаходиться значна кількість контамінантів.

Якщо вказаний період упущений, у якості експлантів використовують живці зелених пагонів довжиною 5-7 см із невеликими бруньками в пазухах листків. Застосування менших пагонів, особливо «жировиків», призводить до інтенсивного виділення фенольного ексудату, а в старших за віком відмічається інтенсивне контамінування ендogenous мікрофлорою. Для зменшення утворення фенольного ексудату донори експлантів не менше як за місяць до їх ізоляції заносять у приміщення (теплиця, депозитарій) зі штучним освітленням. Для зниження заселеності контамінантами також проводять обробку фунгіцидами, а у випадках бактеріального забруднення – антибіотиками. Наприклад, препаратом “Казумін” (20-30 г/л).

Для стерилізації застосовують розчин препарату “Бланідас 300” (0,7-0,8г на 100 мл автоклавованої дистильованої води). Експозиція обробки – 20 хвилин. Потім експланти 2-3 рази промивають у автоклавованій дистильованій воді. Після промивки у них видаляють некротизовані та із слідами опіків ділянки. У випадку, якщо прогнозується сильна заселеність ендogenous мікрофлорою, етап доповнюється такими заходами:

- перед обробкою розчином Бланідас 300 експланти впродовж години витримують у розчині фунгіциду “Превікур Енерджі 840 SL” (1,0-1,5 мл на 100 мл дистилату);

- додавання в живильне середовище біоциду (часто застосовується як консервант) РРМ^{ТМ} 1,5-2,0 мл/л. За його використання експланти на 2-3 тижні занурюють повністю в живильне середовище;

- якщо експланти за повного занурення мають ознаки гіпоксії, РРМ^{ТМ} замінюють на 3-5 г нітрату срібла (AgNO₃) на літр живильного середовища;

Висаджують експланти на живильне середовище. У перші один-два субкультивування вміст цитокінінів збільшують у 1,-2,0 рази. Нами застосовується середовище із макроелементами за Кворіном-Лепуавром, мікроелементами за Мурасіге-Скугом.

Хід приготування маточних розчинів подібний протоколу в підрозділі 8.1. Хоста. Але є такі зміни: маточний розчин макросолей за Кворіном і Лепуавром (макросолі QL див. табл. 8.13); маточний розчин кальцію за Кворіном і Лепуавром (кальцій QL див. табл. 8.14).

II. Розмноження, нарощування необхідної кількості рослинного матеріалу *in vitro*. Для введення в асептичні умови, підтримання колекції використовують середовище вказане в таблиці 8.15. Для отримання високих коефіцієнтів шляхом утворення конгломератів із 5-9 мікропагонів субкультивування проводять на середовищі для розмноження, яке розписано в протоколі для малини.

Живцювання проводять одним із двох способів: поділом стебла; поділом куща (конгломерата) на окремі пагони.

Таблиця 8.13.

Макросолі за QL (розчиняти в літровій колбі)

№ п/п	Хімічна формула компонента	г на 1 л маточного розчину
1	NH_4NO_3	16,00
2	KH_2PO_4	10,8
3	KNO_3	72,0
4а	MgSO_4 безводний або х 2,047	7,12
4б	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	14,39

*Примітка: Молярна маса MgSO_4 безводний $\sim 120,37$; Молярна маса $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ $\sim 246,37$; співвідношення цих молярних мас становить 2,047

Таблиця 8.14.

Кальцій за QL (розчиняти в літровій колбі)

№ п/п	Хімічна формула компонента	г на 1 л маточного розчину
I	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	33,352

Готується окремо від макросолей, тому що в маточних розчинах разом з ними випадає в осад

Таблиця 8.15.

Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ в мл (варіант для розмноження)

№ п/п	Інградієнт середовища	мл		
		1 літр	3 літри	6 літрів
1	Макросолі QL	25	75	150
2	Мікросолі	1	3	6
3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (1:40) QL	25	75	150
4	Fe-хелат, або Ferrilene 4.8 Orto-Orto	30	90	180
5	Вітамін В ₁ (тіамін)	1,6	4,8	9,6
6	Вітамін В ₆ (піридоксин)	1,0	3,0	6,0
7	Вітамін С (аскорбінова кислота)	3,0	9,0	18,0
8	Нікотинова кислота	1,0	3,0	6,0
9	Гліцин	0,5	1,5	3,0
10	Інозитол (1:10)	10	30	60
11	Аденін (1:1)	0,1	0,3	0,6
12	Бензиламінопурін (1:1)	0,25-0,5	0,75-1,5	1,5-4,5
13	Індолілмасляна або нафтилоцтова кислота (1:1)	0,1	0,3	0,6

pH 5,7

III. Укорінення проводять *in vitro*. Для цього готують нижче вказане середовище (табл. 8.16).

IV. Постасептичну адаптацію проводять в умовах вологої камери. Протягом 2-3 тижнів регенеранти переважно нарощують кореневу систему і лише потім спостерігається ріст пагона (рис 8.8).

Використовують торфовий субстрат із рН, близьким до 6.0. Починаючи із другого тижня вологість поступово знижують.

Таблиця 8.16.

Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ в мл (варіант для укорінення)

№ п/п	Інградієнт середовища	мл		
		1 літр	3 літри	6 літрів
1	Макросолі QL	12,5	32,5	75
2	Мікросолі	0,5	1,5	3,0
3	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O (1:40) QL	12,5	32,5	75
4	Fe-хелат, або Ferrilene 4.8 Orto-Orto	25	75	150
5	Вітамін В ₁ (тіамін)	1,6	4,8	9,6
6	Вітамін В ₆ (піридоксин)	1,0	3,0	6,0
7	Вітамін С (аскорбінова кислота)	1,0	3,0	6,0
8	Нікотинова кислота	1,0	3,0	6,0
9	Гліцин	0,5	1,5	3,0
10	Інозитол (1:10)	10	30	60
11	Аденін (1:1)	0,1	0,3	0,6
12	Бензиламінопурін (1:1)	0,1	0,3	0,6
13	Індолілмасляна кислота (1: 1)	1,5	4,5	9,0
14	Активоване вугілля, г	1,0	3,0	6,0



Рис. 8.17. Адаптований регенерант аличі (Мірабоолано 29С) впродовж 15 днів

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Адамова А. И. Эффективность оценки и отбора исходных оздоровленных линий для использования в оригинальном семеноводстве / А. И. Адамова // Вопросы картофелеводства: материалы научн.–практ. конф. «Научное обеспечение картофелеводства России: состояние, проблемы» (к 70-летию ВНИИКХ).– М., 2001.– С.189-195.
2. Албертс Б. Молекулярная биология клетки: В 3т., 2-е изд., перераб., доп. / Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис / Пер. с англ. – М.: Мир, 1997. – Т.1. – 517 с.
3. Андреевко Т. И. Активация фотоавтотрофного роста растений-регенерантов картофеля *in vitro* / Т. И. Андреевко, Л. Н. Цоглин, О. С. Мелик-Саркисов, В. В. Розанов // Доклады Российской Акад. Сельхоз. Наук. — 1993. — № 2. — С. 3–8.
4. Анисимов Б.Ф. Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля (практическое руководство) / Б. Ф. Анисимов. – М.: Росинформагротех. 2004 – 80 с.
5. Ахметова А.Ш. Интродукция и размножение тюльпанов *in vivo* и *in vitro* в Лесостепной зоне Башкирского Предуралья: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: 03.00.05 «Ботаника» / А. Ш. Ахметова.– Оренбург.– 2009.– 23 с.
6. Барышникова С.В. Морфогенетический потенциал в культуре тканей трудноразмножаемых древесных растений / С. В. Барышникова, С. Н. Тимофеева //Сборник статей по материалам III всероссийской научно–практической конференции «Биотехнология, как инструмент сохранения биоразнообразия растений мира» Волгоград, 4–6 августа 2010г. Аватар.–2010.– С.270-276.
7. Бернье Ж. Физиология цветения. В 2 томах. Т. I. Факторы цветения / Ж. Бернье, Ж.-М. Кине, Р. М. Сакс // Пер. с англ. – М.: Агропромиздат, 1985. – 192 с.
8. Белогубова Е.Н Современное овощеводство закрытого и открытого грунта: Учеб. пособие для агр. учеб. заведений по спец. 1310 «Агрономия»/ Е.Н. Белогубова, А.М. Васильев, Л.С. Гиль и др. – К.: ОАО «Изд-во «Киев. Правда», 2006. – 528 с.
9. Бемстер А. Перемещение вируса в растениях картофеля и возрастная устойчивость / А. Бимстер // Вирусные болезни и семеноводство картофеля. / Пер с англ. М.: Колос, 1976. – С. 206 -221.
10. Билай В.И. Микроорганизмы – возбудители болезней растений / В.И. Билай, Р.И. Гвоздяк, И.Г. Скрипаль и др.: Под ред. Билай В.И. (Справочник)– К.: Наукова думка. – 1998, 552 с.
11. Блоцкая Ж.В. Вирусы картофеля / Ж. В. Блоцкая. – Минск: Ураджай, 1989, – 284 с.
12. Блоцкая Ж.В. Оптимизация приемов оздоровления, размножения и защиты семенного картофеля от вирусной инфекции (методические указания) / Ж.В. Блоцкая, Тимофеев Н.И., Зубкевич О.Н., Сильванович Н.А., Жукова М.И. – Минск, 1996. – 63 с.
13. Большакова М.О. Абсцизова кислота та цитокиніни ксерофітних видів / М. О. Большакова, Л. І. Мусатенко // Онтогенез рослин в природньому та трансформованному середовищі: матеріали міжнародн. конф. (Львів, 1– 4 липня, 1998). – Львів : “Сполом”, 1998. – С. 190-191.
14. Бублик О.М. Чинники соматональної мінливості рослин О. М. Бублик //Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів.– 2011.–Том 9.– №1.– С.49-54.

15. Васильченко И. Т. К вопросу об эволюционном значении морфологических особенностей прростания цветковых растений/ И. Т. Васильченко // Сборн. науч. раб. БИН АН СССР, 1945.– 75 с.
16. Вечернина Н.А. Ускоренное размножение голубики топяной *in vitro* / Н. А. Вечернина, О. К. Тварткиладзе, А. А. Эрст // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2008. – №1 (44).– С.45-52.
17. Вечернина Н.А. Адаптация растений–регенерантов с использованием гидропоники / Н. А. Вечернина, О. Л. Таварклидзе, И. Д. Бородулина А. А. Эрст // Известия Алтайского государственного университета .– 2008.– Выпуск №3.– С. 7-10.
18. Вирсема Х. Селекция на устойчивость / Х. Версема // Вирусные болезни и семеноводство картофеля. / Пер с англ. М.: Колос. – 1976. – С. 222-229.
19. Власенко М.Ю. Фізіологія рослин з основами біотехнології / М. Ю. Власенко, Л. Д. Вельямінова-Зернова, В. В. Мацкевич – Біла Церква, 2006. – 504 с.
20. Власенко М.Ю. Детермінація онтогенезу рослин картоплі в умовах *in vitro* синтетичними фітогормонами класу цитокінінів / М. Ю. Власенко, В.В. Мацкевич, П. Г. Дульнев, А. Л. Козак // Матеріали тез міжнародної науково–практичної конференції “Інноваційні агротехнології в умовах глобального потепління. 4–6 червня 2009 р. – Мелітополь–Кирилівка. – Вип. 1. – С.24 - 25.
21. Власюк П.А., Химический состав картофеля и пути его улучшения / П. А. Власюк, Н. Е. Власенко, В.Н. Мицко. – Киев: Наукова думка, 1979.– 195 с.
22. Высоцкий В.А. Действие некоторых регуляторов роста на изолированные меристематические верхушки черной смородины / В. А. Высоцкий // Плодоводство и ягодоводство нечерноземной полосы: М.– 1979. –Том IX.– С. 101–107.
23. Высоцкий В.А. О генетической стабильности при клональном микроразмножении плодовых и ягодных культур / В. А. Висоцкий // Сельскохозяйственная биология. –1995. –№ 5. –С. 57-63.
24. Герасимов С. Б. К вопросу о безвирусном семеноводстве картофеля / С.Б. Герасимов, Ю. А Леонтьева // Современные проблемы семеноводства картофеля на безвирусной основе. – Владивосток. – 1985. – С. 68 - 72.
25. Гиббс А. Основы вирусологии растений / А. Гиббс, Б. Харисон . – М.: Мир, 1978. – 429 с.
26. Гиголашвили Т.С. Условия микроразмножения формируют специфический культуральный фенотип / Т.С. Гиголашвили, О.Н. Родькин, В.Г. Реуцкий // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда: тез. докл. VII междунар. конф. (25–28 ноября 1997 г., Москва). – М., 1997. – С. 182.
27. Гиголашвили Т.С. Особенности водообмена ассимиляционной ткани *Solanum* в условиях *in vitro* / Т. С. Гиголашвили, В. Г. Реуцкий, О. И. Родькин // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1997. – Т.29.–№6. – С. 461-467.
28. Головки Т.К. Фотосинтез и дыхание в связи с клубнеобразованием у картофеля / Т. К. Головки // Регуляция роста и развития картофеля. М.: Наука, 1990. –С. 13-20.
29. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Удосконалення технології клонального мікророзмноження *Miscanthus giganteus* / В.В.Мацкевич, Л.М. Філіпова // Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. Вип.80, частина 1, Агрономія- Умань- 2012р.-с. 129-137

30. Гончаров Н. Д. Применение методов биотехнологии для селекции, оздоровления и размножения картофеля (учебное пособие) / Н. Д. Гончаров, Н. С. Кожушко, В. Д. Рудь // Харьков, 1987.– 67 с.
31. ГОСТ 42–21–2–85 «Дезинфекция и стерилизация медицинского назначения методами, засоби і режими» від 10.07.1985р.
32. Гречаник Р.М. Застосування біотехнологічних методів для розмноження гібриду осики і тополі чорної та мікоризації садивного матеріалу / Р. М. Гречаник, О. Ф. Базюк, З. Д. Бондаренко, Л. В. Федяй // Науковий вісник Український державного лісотехнічного університету, 2003, Вип. 13 С. 210-221.
33. Гречаник Р.М. Особливості введення в культуру *in vitro* шовковиці білої (*Morus alba Linn*) Р. М. Гречаник, М. М. Гузь, Н. О. Олексійченко // Науковий вісник НЛТУ України. – 2011. – Вип. 21.– С.9-21
34. Гродзинский А.М. Краткий справочник по физиологии растений / А.М. Гродзинский, Д. М. Гродзинский. – К. Наукова думка, 1973. – 591с.
35. Григорюк І. П. Біоенергетичні основи стійкості озимої пшениці до посухи: Моногр. / І. П. Григорюк, В. І. Ткачов, М. Ф. Михальський, О. І. Серга; НАН України. Ін-т фізіології рослин і генетики, Київ. нац. ун-т ім. Т.Шевченка. – К. : Наук. світ, 2004. – 202 с.
36. Грин Н. Биология. В 2 томах. Глава 15. Координация и регуляция у растений / Н.Грин, У. Стаун, Д. Тейлор // Перев. с англ. М.: Мир, 1990.–327 с.
37. Данилевич В. Н. Патент РФ 2059417. Способ стерилизации питательных сред / В. Н. Данилевич В. А. Лившиц, опубл. 10.05.1996, Бюл. № 13. — 8 с.
38. Демчук И. В. О необходимости отбора высокопродуктивных линий при оздоровлении сортов картофеля биотехнологическими методами / И. В. Демчук, Е. Н. Петренко, Н. М. Зарицкий // Сб. Картофелеводство.– Минск.– 2007.– Т. 13.– С. 27-37.
39. Демчук І.В. Проблеми оздоровлення картоплі методами біотехнології І. В. Демчук, М. М. Зарицький // Вісник Сумського національного аграрного університету, секція “Агрономія і біологія”.– 2012.– Випуск 2(23).–С. 187-191/
40. Деревинська Т.І. Проблеми і перспективи вирощування арніки на півдні України з використанням мікроклонального розмноження Т. І. Деревинська, Г. А. Зеленіна, Н. С. Любимова // Збірн. наук. праць „Фальцфейнівські читання”. – Херсон: Terra.–2005. – Т. 1. – С. 117-118.
41. Дерябин А.Н. Характеристика физиологических этапов при клональном микроразножении микроклубней картофеля в биореакторах / А.Н. Дерябин: автореф. дис. канд. биол. наук. – М., 1997.– 27 с.
42. Довбиш Н.Ф. Регенераційна здатність та стеблове живцювання інтродукованих деревних листяних рослин на південному сході: автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.05 «Ботаніка» / Н. Ф. Довбиш.– Ялта, 2002. – 20 с/
43. Дубовик В.І. Вплив репродукування оздоровленої еліти на продуктивність насінневої картоплі: дис... канд. с.-г. наук: 06.01.05 – селекція і насінництво / Володимир Іванович Дубовик.– Харків, 2001.– 215 с.
44. Дяконов К. П. Насекомые–переносчики вирусом картофеля в Приморском крае / К. П. Дяконов // Выращивание семенного картофеля на безвирусной основе. – Владивосток, 1973.– С. 80-84.
45. Завірюха П. Д. Сільськогосподарська біотехнологія: Клітинна та генетична інженерія рослин : термінологія для студ. агроном. ф-ту / П. Д. Завірюха [видання 2-ге доп.] – Львів, 2001. – 20 с.

46. Зефирова Н. С. Хімічна енциклопедія: у 5 т. / Зефирова Н. С. (гол. ред.) – Київ: Радянська енциклопедія, 1995. – Т. 4. – С. 278. – 639 с.
47. Замалієва Ф. Ф. Семеноводство картофеля на оздоровленній основі / Ф. Ф. Замалієва // Захиста і карантин рослин. – 2007. - №2. - С. 18-20.
48. Зеленина Г.А. Оптимізація складу поживної середовища для мікророзмноження *Arnica foliosa* методом математического планування експерименту Г. А. Зеленина, О. Л. Шестопаля, С. А. Ігнатової // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2005.– Вип. 91. – С. 104-108.
49. Зеленина Г.А. Вплив компонентів живильного середовища на ефективність мікророзмноження *Arnica foliosa* Nutt. *in vitro* / Г. А. Зеленина // Вісник Харківського національного аграрного університету (сер. Біологія). – 2005. – Вип. 2 (7). – С. 89-93.
50. Зеленина Г. А. Морфогенез в культурі *in vitro* сегментів стебля і клональне мікророзмноження *Arnica chamissonis* Less. *ssp. foliosa* (Nutt.) Maguire: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / Г. А. Зеленина. – Ялта, 2007.– 23 с.
51. Зеленина Г.А. Мікротклональне розмноження та особливості водного обміну регенерантів *Arnica foliosa* / Г. А. Зеленина // Вісник Одеського національного університету. – 2005. – Т.9.– Вип.5. – С. 7-11.
52. Іванова Н.М. Особливості морфогенезу та клональне мікророзмноження деяких квітково–декоративних культур: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: 03.00.20 – біотехнологія / Н. М. Іванова. – Ялта, 2009. – 23 с.
53. Ігнатова О.С. Прогнозування відгуку генотипів озимої пшениці на основі тестування етапів морфогенезу / О. С. Ігнатова, В.І. Файт, М. В. Жосонар, О. Л. Шестопаля // Аграрний вісник Причорномор'я– Одеса, 2002.–№18.– С. 14-17
54. Іванніков Р.В. Біологія розвитку видів роду *Laelia* Lindl. (*Orchidaceae* Juss.) в умовах оранжерейної культури та культури *in vitro*: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.05 «Ботаніка».–К., 2001. – 22 с.
55. Катаєва Н. В. Клональне мікророзмноження рослин / Н. В. Катаєва, Р. Г. Бутенко. М.: Наука, 1986. - С. 96.
56. Калинин Ф.Л. Технологія мікротклонального розмноження рослин / Ф. Л. Калинин, Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. – Київ: Наук. думка, 1992. – 232 с.
57. Камераз А.Я. Генетика стійкості картофеля к патогенам / А. Я. Камераз, И. М. Яшина, Н. П. Скліярова // Генетика картофеля. – М.: Наука, 1973. – С. 175-233.
58. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста / В.И. Кефели // Физиология растений. – 1997. – Т. 44, № 3. – С. 471-480.
59. Климачев Д.А. Влияние обработки гиббереллином на содержание фитогормонов в разных условиях минерального питания / Д. А. Климачев, А. А. Тарасенко // Иммуноанализ регуляторов роста в решении проблем физиологии растений, растениеводства и биотехнологии. Материалы III конференции. Уфа, 3–6 октября 2000 г. Уфа.–2000.– С. 224.
60. Кнуянц И.Л. Натрия гипохлорит: Химическая энциклопедия / Главный редактор И. Л. Кнуянц. – М.: Советская энциклопедия, 1992. – Т. 3. – С. 355.
61. Ковальчук М.В. Праймування корисними бактеріями в технологічному процесі клонального мікророзмноження картоплі / М. В. Ковальчук, В. Б. Рязанцев, І. І. Костюк, Н. О. Козирівська // Вісник аграрної науки. – 2005. – № 7. – С. 43-45.

62. Ковалевская Ж.В. Корнеобразование стеблевых черенков представителей рода *Ilex* L. при искусственном вегетативном размножении / Ж.В. Ковалевская // Вісник донецького національного університету, Сер. Природничі науки.– 2008.– Вип. 2.– С. 96-104.
63. Ковальчук И.Ю. Микрклональное размножение малины, как метод сохранения биоразнообразия растений в Казахстане / И.Ю. Ковальчук, З.Р. Мухитдинова, Т.Т. Турдиев, Г.К. Успанова Н.И. Чуканова // Сборник статей по материалам II Всероссийской научно–практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира» – Волгоград, 2008. – С.67.
64. Ковальчук М. В. Застосування бактерій з протекторними властивостями для адаптації рослин картоплі при клональному мікророзмноженні до умов *ex vitro* та для захисту посадкового матеріалу від фітопатогенів / М. В. Ковальчук, В. Б. Рязанцев, І. І. Костюк, О. В. Подоліч, С. А. Лященко, Н. О. Козировська; Інститут молекулярної біології та генетики НАН України. – К., 2006. – 14 с.
65. Кононученко В.В. Картопля / За ред. В.В. Кононученка, М.Я. Молоцького, – Біла Церква, 2002.– Т.1.– 536 с.
66. Кононученко В. В. Методичні рекомендації щодо проведення досліджень з картоплею / за ред. В. В. Кононученка, В. С. Куценка, А. А. Осипчука / Ін-т картоплярства УААН. – Немішаєве, 2002. – 185 с.
67. Козак А.Л. Ріст і розвиток регенерантів хризантеми та гвоздики під час клонального мікророзмноження залежно від походження живців / А. Л. Козак // Агробіологія. Збірник наукових праць.– 2010.– Випуск 3(74).– С.84-87.
68. Костина В. М. Особенности фенольного метаболизма растений рода *Rhododendron* L. *in vivo* и *in vitro*: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 03.00.12 «Физиология и биохимия растений» / В. М. Костина.– М., 2009.– 22 с.
69. Кренке Н.П. Регенерация растений / Н. П. Кренке // М.–Л.– АН СССР. – 1950. – 675 с.
70. Кренке Н.П. Теория циклического старения и омоложения растений и практическое ее применение/ Н. П. Кренке. – М. : Сельхозгиз, 1940. – 135 с.
71. Кудоярова Г.Р. Влияние бензил–6–аминопурина на рост и содержание ауксинов в проростках пшеницы и кукурузы / Г. Р. Кудоярова, И. Р. Теплова, Р. А. Докичева, И. Ю. Юсманов, С. Ю. Веселов // Иммуноанализ регуляторов роста в решении проблем физиологии растений, растениеводства и биотехнологии. Материалы III конференции. Уфа, 3–6 октября 2000 г. Уфа.–2000. – С. 224
72. Кулаева О.Н. Как регулируется жизнь растений / О. Н. Кулаева // Соросовский образовательный журнал. –1995.– № 1.– С. 20-27.
73. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого–біохімічні основи / В.А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
74. Куперман Ф.М. Морфофизиология растений. Морфофизиологический анализ этапов органогенеза различных жизненных форм покрытосеменных растений /Ф. М. Куперман.– М., «Высш. школа».– 1973. – 256 с.
75. Куценко В.С. Картопля. Хвороби і шкідники / За ред. В.В. Кононученка, М.Я. Молоцького.–К., 2003.– Т. 2.– 240с.
76. Курчій Б.О. Біологічна роль абсцизової кислоти і етилену та їхній синтез в рослинах за дії стресів 2002 року: автореф. дис. д-ра біол. наук: 03.00.04 «Ботаніка» /; О. Б. Курчій.– Київ, 2002. – 39 с.

77. Курчій Б.О. Абсцизова кислота як кінцевий продукт антиокислювального метаболізму ксантофілів, зумовленого дією диквату / Б. О. Курчій // Фізіологія і біохімія культ. рослин.– 2000. –Т. 32. –№ 4. –С. 334-338.
78. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька.– К.: Наукова думка, 2005.– 271 с.
79. Ламберова М.Э. Патент №2324338 (РФ). Способ получения биомассы *in vitro* / М.Э. Ламберова, В.Н. Хмелев, А.А. Ламберова, А.Н. Хмелева, А.С. Косолапова / 2008; заявл. 25.01.2007 ; опубл. 20.05.2008, Бюл. № 14. — 7 с.
80. Лященко С.А. Відтворення садивного матеріалу картоплі, отриманого в культурі меристем *in vitro*, із застосуванням мікробіологічних препаратів : автореф. дис. канд. с.–г. наук : 06.01.05 «Селекція і насінництво» / Лященко Софія Анатоліївна.– К, 2013. – 20 с.
81. Лященко С.А. Вплив віку вихідних рослин картоплі на ріст та розвиток регенерантів при живцюванні / С. А. Лященко, В. В. Мацкевич // Картоплярство. – 2006. – Вип. 34–35.– С. 79-85
82. Майщук З.Н. Влияние культуры меристемы на изменчивость признаков картофеля / З. Н. Майщук // Современные проблемы семеноводства картофеля на безвирусной основе. – Владивосток. – 1985. – С. 10 – 17
83. Майщук З. М. Клональне мікророзмноження картоплі *in vitro*. Стан, проблеми, перспективи (навчальний посібник) / З. М. Майщук.- Львів, 1998.- 95 с.
84. Майщук З. М. Мінливість ознак та доцільність застосування клонових доборів на меристемному насінневому матеріалі / Є. М. Майщук // Зб. Картоплярство.– К.: Урожай.– 1991.– Вип. 22.– С. 22-26.
85. Макрушин М.М. Фізіологія рослин. / М.М. Макрушин, Є.М, Макрушина, Н.В. Петерсон, М.М. Мельников. – Вінниця: Нова книга, 2006. – 413 с.
86. Мамчур А. Е. К вопросу о вырождении картофеля и изменчивости при культивировании *in vitro* / А. Е. Мамчур, Ю. А. Дмитрук, Н. А. Погорилько // Бюл. Ін-ту с.–г. Мікробіології.– 1998.– №6.– С. 26-29.
87. Марчук О.О. Збереження та розмноження цінних генотипів *in vitro* / О.О. Марчук, В.І. Кирилюк // Наукові доповіді НАУ. – 2008. - № 4 (12). - [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://www.nbu.gov.ua/e-Journals/nd/2008-4/08mmdomm.pdf>
88. Маслікова К.П. Порівняльна оцінка методів виділення збудника фітофторозу томата (*Phytophthora infestans*) в чисту культуру та його ріст на різних поживних середовищах / К. П. Маслікова // Мат. конф. викладачів і аспірантів ДДАУ. – Дніпропетровськ: ДДАУ, 2001.– С. 14–15.
89. Матеріали проміжного звіту за договором № 2М/ 136–2001, від 5 червня 2001 EUROFOREST: «Нові технології, орієнтовані на перехід європейського лісового сектору на засади сталого розвитку» І етап. Харків:УкрНДІЛГА. – 2001. – 50 с.
90. Мацкевич В.В. Удосконалені методи оздоровлення картоплі від вірусів та використання отриманого матеріалу в первинному насінництві: дис.... канд. с.–г. наук: 06.01.14 – насінництво / В.В. Мацкевич. – Київ, 2004. – 153 с.
91. Мацкевич В.В. Використання сполук з фітогормональною активністю в біотехнології картоплі / В. В. Мацкевич, П. Г. Дульнєв, А. М. Широконос // Вісник Державної агроекологічної академії України.– 2000. – С.46-47.
92. Мацкевич В. В. Прояв онтогенетичної різноякісності та особливості впливу вірусної інфекції на ріст, розвиток і продуктивність рослин картоплі / В. В. Мацкевич, О. П. Таран // Картоплярство. –2000.– Вип. 30. – С. 176-184

93. Мацкевич В.В. Методичні вказівки для забезпечення самостійного вивчення теоретичної частини “Фізіології рослин” студентами денної та заочної форми навчання.// Мацкевич В.В., Олешко О.Г., Роговський С.В. Біла Церква, 2009. –153 с.
94. Мацкевич В.В. Особливості введення *in vitro* та клонального мікророзмноження *Astrophytum myriostigma* та *Sclerocactus sp.* / В. В. Мацкевич, Л. А. Козак, Л. М. Філіпова //Агробіологія: збірник наукових праць БНАУ. – Біла церква, 2012. – 8 (94).– С. 115-118.
95. Мацкевич. В.В. Основи біотехнології рослин: навчальний посібник / В.В. Мацкевич, С.В. Роговський, М.Ю. Власенко, В.М. Черняк. – Біла Церква: БНАУ, 2010. – 156 с.
96. Мацкевич В.В. Застосування “ культури одного вузла” як елементу ресурсозберігаючої технології одержання мікробульб *in vitro* / В. В. Мацкевич, І. П. Чечітко // Картоплярство. – 2003. – Вип. 32.– С. 113-117.
97. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Диба Р.Д. Особливості стерилізації експлантів хости / В. В. Мацкевич, Л. М. Філіпова, Р. Д. Диба // Науковий вісник НЛТУ: збірник науково — технічних праць. – Львів: РВВ НЛТУ України.– 2013.– вип.23.– С. 183–187.
98. Мацкевич В.В. Особливості бульбоутворення з живців рослин *in vitro* сорту Подолянка залежно від компонентів живильного середовища / В.В. Мацкевич, М.Ю. Власенко, В. В. Хоменко // Картоплярство України.– 2009.– Вип. № 3–4 (16–17).– С. 23–27.
99. Мацкевич В.В. Прояв онтогенетичної різноякісності та особливості впливу вірусної інфекції на ріст, розвиток і продуктивність рослин картоплі / В. В. Мацкевич, В. С. Різник, О. П. Таран// Картоплярство. –2000. –Вип. 30. – С. 176-184
100. Мацкевич В.В. Онтогенез картоплі в культурі *in vitro* / В. В. Мацкевич // Картоплярство. –2002. – Вип. 31.– С. 107-111
101. Мацкевич В.В. Ефективність тривалого клонального мікророзмноження *Thuja occidentalis* ‘Smaragd’ залежно від компонентів живильного середовища та стану експлантів / В. В. Мацкевич, М. Ю. Власенко, Л. М. Філіпова // Збірник праць уманського національного університету садівництва «Агрономія».– 2010. – Вип. 74. –С. 324-329
102. Мацкевич В.В. Особливості введення *in vitro* та клонального мікророзмноження *Hosta* / В. В. Мацкевич, Л. М. Філіпова, А. П. Стадник // Агроекологічний журнал.– 2012 .– Вип. 4.– С. 56-61.
103. Мацкевич Н.О. Особливості індивідуального розвитку картоплі при клональному мікророзмноженні / Н. О. Мацкевич, О. С. Пустовіт, М. Ю. Власенко, В. В. Мацкевич // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. – 2007. – Вип. 46. – С. 27-31.
104. Мацкевич О. В. Особливості деконтамінації та культивування експлантів ожини / О. В. Мацкевич, В. В. Корж // «Новітні технології в рослинництві»: Тези доповідей державної студентської наукової конференції. – Біла Церква, 2015. – 78 с.
105. Мацкевич О.В. Вплив 6–бензиламінопурину на гіпергідратацію регенерантів *Rubus fruticosus* L. та *Rubus idaeus* L. / О. В. Мацкевич, В. В. Андрієвський, Л. М. Філіпова // Матеріали IV Всеукраїнської науково–практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених, «Біотехнологія: звернення та надії» 21–22 травня 2015.– Київ.– С. 143-144.

106. Мельниченко Г. И. Результаты сравнительного изучения меристемных линий картофеля / Г. И. Мельниченко, И. И. Лапнева // «Актуальные проблемы картофелеводства». – М. – 1993. – С. 12-15.
107. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, А. А. Кунах. – К.: Поліграфконсалтинг, 2003. – 517 с.
108. Меметова Э.Ш. Способ стерилизации побегов и семян винограда гидроксихлоридом алюминия / Э. Ш. Маметова // Виноградарство и виноград. – 2011. – №11. – С. 5–6
109. Митриченко А.Н. Динамика содержания гормонов в проростках пшеницы при изменении температуры: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 03.00.12 «Физиология растений» / А. Н. Митриченко. – Уфа, 1999. – 22 с.
110. Метьюз Р. Вирусы растений / Р. Метьюз. – М.: Мир. – 1973. – 600 с.
111. Молканова О. И. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L. / О. И. Молканова, О. А. Чурикова, Л. Н. Коновалова, И. Б. Окунева // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. – 2002. – №4. – С. 8-14.
112. Мороз П.А. Аллелопатическая активность некоторых фенольных соединений / П. А. Мороз, Н. Ф. Комиссаренко // Роль токсинов растительного и микробного происхождения в аллелопатии. – Киев: Наук. думка. – 1983. – С. 118-122.
113. Молоцький М.Я. До питання виродження картоплі в степовій і лісостеповій зонах України і заходи боротьби з ним / М.Я. Молоцький // Картоплярство. – К.: Довіра, 1999. – С. 19-27.
114. Мусієнко М.М. Фізіологія рослин / М. М. Мусієнко – К: Либідь, 2005. – 808 с.
115. Мухаметвафина А.А. Фрагменты бутонов лилий как перспективные экспланты для микрклонального размножения лилий / А. А. Махаметвафина // Материалы IX Международной конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». – Звенигород, 8—12 сентября 2008 г. – С. 56-57.
116. Набиева А. Ю. Клональное микроразмножение сортов *Neurocallis* и *Hosta* при использовании эксплантов и органов цветка / А. Ю. Набиева // Труды Никитского ботанического сада. – 2009. – Том 131. – С.47-50.
117. Небиков М. В. Удосконалення методики стерилізації експлантів унаслідок введення у культуру *in vitro Castanea sativa* Mill. / М. В. Небиков, В. Д. Адаменко // Науковий вісник НЛТУ України. – 2011. – Вип. 21. – С. 30-34
118. Немойкина Л. Влияние света и гормонов на морфогенез юки слоновой в культуре *in vitro*: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук 03.00.05 «Ботаника», 03.00.12 «Физиология и биохимия растений» / Л. Немойкина. – Томск, 2003. – 24 с.
119. Нижник Т.П. Фізіологічні основи та способи підвищення стійкості картоплі до посухи 2001 року: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: 03.00.12 «Фізіологія рослин» / Т. П. Нижник. – К., 2001. – 21 с.
120. Оразбаева Г.К. Клональное размножение растений черной смородины (*Ribes nigrum* L.) *in vitro* / Г. К. Оразбаева, В. Т. Хасанов, А. Р. Исхаков, В. К. Швидченко // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. – 2012. – N 1. – С.115-124
121. Оглуздин Н. С. Оздоровление и сохранение генофонда диких видов картофеля: автореф. дис... канд. с.-х. наук: 06.01.05 / Н.С. Оглуздин. – Ленинград, 1982. – 23 с.

122. Остапенко Д.П. Бульбоутворення *in vitro* залежно від способу підготовки вихідних для черенкування рослин / Д. П. Остапенко, В. С. Різник // Картоплярство. – 1993. – Вип. 24. – С. 36 - 38.
123. Плаксина Т.В. Особенности размножения алтайских генотипов вишни и микровишни с использованием методов биотехнологии: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. с.-х. наук: спец. 06.01.07 «Плодоводство, виноградарство». – Барнаул, 2008.– 23 с.
124. Полещук С.В. Біологічна активність антиоксидантів в культурі тканин томата *in vitro* : автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.20 «Біохімія»/ С. В. Полещук.– Херсон, 1998. –18 с.
125. Подгаецкий А. А. Использование диких мексиканских видов картофеля серии *Bulbocastana Rydb.*, *Cardiophylla Buk.*, *Pinnatisecta (Ridb.) Buk* в селекции на фитотроустойчивость: Автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. с.-х. наук : (06.01.05) / Подгаецкий Анатолий Адамович.– Немешаево, 1977.– 172 с.
126. Подоба Ю.В., Біотехнологічні аспекти оцінки асоціативних відносин бактерій *Enterobacter aerogenes* 30Ф з різними сортами ячменю: Автореферат дисертації на здобуття вченого ступеня канд. с.-г. наук : 03.00.20 / Ю.В. Подоба ; Інститут агроекології та біотехнології, УААН. - Київ, 2005. - 17 с
127. Подоліч О.В. Взаємодія ендоефітних бактерій з рослинами картоплі: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.16 / О. В. Подоліч.– Київ, 2008. 20 с.
128. Попкова К. В. Болезни картофеля / К.В. Попкова, Ю.П. Шнейдер, А.С. Воловик, В.А. Шмыгля. – М.: Колос, 1980 – 304 с.
129. Попкова К.В. Защита картофеля в условиях идустриальной технологи / К. В. Попкова, А. С. Воловик, Ю. И. Шнейдер, В. А. Шмигля .– М.: Россельхозиздат, 1986. – 151 с.
130. Попкова Л.Л. Особенности морфогенеза некоторых орхидных Крыма при семенном размножении *in vitro* / Л. Л. Попкова, О. В. Митрофанова // Бюл. бот. сада им. И. С. Косенко Кубанского госагроуниверситета. – Краснодар, 1998.–№ 7. – С. 125-127.
131. Попкова Л.Л. Рідкісні види орхидних флори Криму, їх мікророзмноження та підтримання біологічної різноманітності: автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.05 «Ботаніка» / Л. Л. Попкова.– Ялта, 1999. – 17 с.
132. Пузина Т.И. Ключевые соотношения фитогормонов и их роль в регуляции физиологических процессов растения картофеля / Т. И. Пузина, И. Г. Кириллова // Иммуноанализ регуляторов роста в решении проблем физиологии растений, растениеводства и биотехнологии. Материалы III конференции. Уфа, 3–6 октября 2000 г. Уфа.–2000– С.224.
133. Пустовойтова Т.Н. Основные направления в изучении влияния засухи на физиологические процессы у растений / Т. Н. Пустовойтова, В. Н. Жолкевич // Физиол. и биохим. культ. раст. 1991.– Т. 24.–№1.– С.14-26.
134. Редько В. І. Методичні рекомендації по мікроклональному розмноженні цукрових буряків / В. І. Редько, Л. Л. Павловська, В. О. Білоус.– К., 1997.– 10 с.
135. Резник В. С. Факторы повышения эффективности клубнеобразования *in vitro* и использование микроклубней в первичном семеноводстве картофеля : дисс... канд. с.-х. наук / Резник В. С. ; Ин-т картофелеводства. – Немешаево, 1992. – 138 с.

136. Реуцкий В.Г. Жизнеспособность растений картофеля *in vitro*. Анализ проблемы и методика оценки // В.Г. Реуцкий, П.А. Родионов, Е.С. Зубей, Н.С. Аншихмина // Сб. науч. тр. Картоелеводство РУП НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству – 2007. – Т. 12. – С. 93-104.
137. Різник В.С. Оздоровлення картоплі: проблеми і перспективи / В. С. Різник // Картоплярство. – К.: Аграрна наук.–1997. – Вип. 27. – С. 117-123.
138. Різник В. С. Оптимізація технології одержання мікробульб *in vitro* та їх використання в первинному насінництві картоплі / В. С. Різник, І. І. Костюк // Зб. Картоплярство.– К.: Довіра, 1999.– Вип. 29.– С.92–98.
139. Родькин О. И. Изучение закономерностей сохранения качества семенного материала при клоновом отборе оздоровленного картофеля / О. И. Родькин, Г. И. Счастленок, Н. Н. Митрофанова // «Актуальные проблемы современного картофелеводства» Материалы, Междунар. Научн. Конф., посвященной 90-летию со дня рождения академика П. И. Альсмика.– Минск.– 1997.– С. 104.
140. Роїк М. В. Клональне мікророзмноження міскантусу. Методичні рекомендації / М. В. Роїк, В. Л. Курило, В. І. Войтовська, Т. М. Недяк, Н. С. Бех, О. І. Присяжнюк // К., 2013.– 24 с.
141. Сакало В.Д. Метаболізм сахарози і його регуляція в рослинах з різним складом запасних вуглеводів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д–ра біол. наук: 03.00.12 «Фізіологія і біохімія рослин» / В. Д. Сакало.– К., 2004. – 41 с.
142. Силина З. М. Формообразование у тюльпана (*Tulipa sp.*) в связи с активизацией пазушных меристем З. М. Силина, М.Ф. Данилова // Морфогенез растений, 1961. –Т.3. –С. 180–187.
143. Симонян М.В. Цитокининоксидаза: биохимические свойства, механизмы регуляции активности и физиологическое значение / М. В. Симонян, С. Ю. Веселов // Иммуноанализ регуляторов роста в решении проблем физиологии растений, растениеводства и биотехнологии. Материалы III конференции. Уфа, 3–6 октября 2000 г. Уфа.–2000. – С. 224.
144. Серебряков И. Г. Морфология вегетативных органов высших растений / И. Г. Серебрякова.– М.: Советская наука, 1952. – 392 с.
145. Склярченко Д.А. Використання клонального мікророзмноження *Onobrychys pallasii (willd bieb)* з метою збереження виду / Д. А. Склярченко, А. М. Бугара // Тематический сборник Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана. – 2002.– Выпуск 12. – С. 44-48.
146. Скрипченко Н. В. Динаміка вмісту фенольних речовин в пагонах актинідії та регенераційна здатність при розмноженні / Н. В. Скрипченко // Вісник харківського національного аграрного університету. Серія «Біологія».– 2009.–Вип. 1 (16).– С. 63–67
147. Сукорина В. В. Обработка методов стерилизации эксплантов озимого чеснока при введении в культуру *in vitro* / В. В. Скорина, И. Г. Халаимова, Т. В. Никонович. IX Международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» – Звенигород, 8—12 сентября 2008 г.– С. 56-57.
148. Таран О. П. Регенераційна здатність рослин картоплі за дії абіотичних чинників у культурі *in vitro* та *ex vitro* / Таран О.П.: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. біол. Наук: спец. 03.00.12 «Фізіологія рослин».– К., 2011. – 21 с.
149. Теслюк П.С. Насінництво картоплі / П. С. Теслюк, М. Я. Молоцький, М. Ю. Власенко. – Біла Церква, 2000. – 153 с.

150. Тимошенко І. І. Проблеми і перспективи селекції і насінництва картоплі в Західному регіоні / І. І. Тимошенко, П. Д. Завірюха, З. М. Майщук // Вісник аграрної науки. – 2001. – №9. – С. 73-77.
151. Тітаренко Т.Є. Розмноження буковинських сортів горіха грецького (*Juglas regia* L.) / Т. Є. Тітаренко, Т. В. Медведєва, Г. М. Сатіна, Л. Ф. Сатіна // Садівництво. – 2009. – Вип. 62. – С. 58-64.
152. Тихомирова Л.И. Особенности индуцированного морфогенеза у различных типов эксплантов *in vitro* культиваров видов рода *Iris* L.: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.05 «Ботаника» / Л.И. Тихомирова. – Барнаул, 2011, 21 с.
153. Тихомирова Л.И. Особенности введения в культуру *in vitro* ириса сибирского (*I. sibirica* L.) / Л. И. Тихомирова // Аграрная наука сельскому хозяйству. Сборник статей V Международной научно-практической конференции – Барнаул, 2010. – Книга 2. – С. 380–383.
154. Тринклер Ю.Г. Большой цикл развития картофеля и возможности размножения его семенами: автореф. дис. докт. биол. наук / Ю. Г. Тринклер. – М., 1975. – 26 с.
155. Трофимец Л. Н. Методические указания по оздоровлению и ускоренному размножению картофеля / Л. Н. Трофимец, В. А. Князев, Л. М. Хромова, Д. П. Остапенко. – М., 1976. – 62с.
156. Трускинов Э. В. Меристемный картофель: особенности и проблемы получения и использования / Э. В. Трускинов, Д. В. Флорова // Материалы Междунар. юбил. научн.-практ. конф., посвященной 75-летию И-Та картофелеводства НАН Беларуси. – Минск, 2003. – Ч1. – С. 322-329.
157. Трускинов Э.В. Поддержание и хранение коллекционных образцов картофеля в условиях *in vitro* (Методические указания) / Э.В. Трускинов. – Л., ВИР, 1987. – 39 с.
158. Турецкая Р.Х. Вегетативное размножение растений с применением стимуляторов роста / Р. Х. Турецкая, Ф. Я. Поликарпова // М.: Наука, 1968. – 94 с.
159. Улинець В.З. Вплив вірусної інфекції на спектральні характеристики фотосинтетичного апарату рослин родини *Solanaceae*: автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.06 «Ботаника» / В. З. Улинець. – К., 2002. – 22 с.
160. Федоров Ал. А. Жизнь растений. В 6-ти т. Гл. ред. чл.-кор. АН СССР, проф. Ал. А. Федоров. Т. 4. Мхи. Плауны. Хвощи. Папоротники. Голосеменные растения. Под ред. И. В. Грушвицкого и С. Г. Жилина. М., "Просвещение", 1978. 447 с. Жизнь растений. Т. 4. — М.: Просвещение, 1978. — С. 49-96.
161. Филипня В.Л. Микрклональное размножение *Rhododendron × hybridum hort.* / В. Л. Филипня, В. И. Горбачевич, Т. В. Антонова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. Т. 41. – № 6. – С. 516-519.
162. Філіпова Л.М. Ефективність природних та синтезованих регуляторів росту при застосуванні під садивні бульби картоплі: автореф. дис. канд. с.-г. наук: 06.01.09 «Рослинництво»/ Л. М. Філіпова. – К., 2002. – 19 с.
163. Хмелев В.Н. Многофункциональные ультразвуковые аппараты и их применение в условиях малых производств, сельском хозяйстве и домашнем хозяйстве / В.Н. Хмелев, О.В. Попова. Барнаул. – Барнаул: изд. АлтГТУ, 1997, – 160с.
164. Хох Н.А. Особенности вирусной реинфекции оздоровленного семенного картофеля и пути ее ограничения в условиях западного региона республики Беларусь: автореф. дис. канд. с.-х. наук / Н.А. Хох. Прилуки. – 2002. – 19 с.

165. Чайлахян М.Х. Механизмы клубнеобразования у растений / М.Х. Чайлахян // Сб. докл. Всесоюзного совещания «Регуляция роста и развития картофеля». – М.: Наука, 1990. – С. 48-62.
166. Черевченко Т.М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т.М. Черевченко, А.Н. Лаврентьева, Р.В. Иванников; НАН Украины, Нац. бот. сад им. Н.Н. Гришко. – Киев: Наукова думка, 2008. – 559 с.
167. Чечітко І.П. Відтворення насіннєвого матеріалу картоплі в Україні: сучасний стан та перспективи / І. П. Чечітко, В. В. Мацкевич // Картоплярство. – 2004. – Вип. 33. – С. 31-42.
168. Чечітко, І. П. Відтворення та контроль якості насіннєвої картоплі в Голландії / І. Чечітко // Агроном. – 2008. – №4. – С. 74-79.
169. Чурикова О. А. Некоторые закономерности морфогенеза *in vitro* / О. А. Чурикова // Биотехнология. – 2008. – С. 201-210.
170. Чурикова О.А. Изучение закономерностей функционирования верхушечной меристемы побега и особенностей морфогенетических процессов в культурах растений разных таксономических групп / О. А. Чурикова // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. – 2005. – №3. – С. 52-64.
171. Чурикова О.А. Регенерационная способность некоторых луковичных и клубнелуковичных однодольных / Морфогенетический аспект / О. А. Чурикова, Р. П. Барыкина // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. – 1995. – №2. – С. 58-66.
172. Шеперс А. Меры борьбы с тлями–переносчиками в Нидерландах / А. Шиперс // Вирусные болезни картофеля / Пер. с англ. М.: Колос, 1976. – С. 198-199.
173. Шорников Д. Г. Совершенствование технологии размножения редких в культуре садовых растений в культуре *in vitro* и оценка их потенциала устойчивости к абиотическим стрессорам: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. с.-х. наук: 06.01.05 «Селекция и семеноводство» / Д. Г. Шорников. – Мичуринск, 2008. – 24 с.
174. Штильман М.И. Физиология растений / Штильман М.И., Тсатсакис А.М., Влахос И. и др. // Физиология растений и генетика. – 2004. Т. 44, № 6. С. 861-864.
175. Blackman P. G. The effects of cytokinins and ABA on stomatal behaviour of maize and *Commelina* / P. G. Blackman, W. J. Davies // Exp. Bot. – 2011. – 34. – P. 1619-1626.
176. Brand M.N. *In vitro* rejuvenation of *Betula* (*Betulaceae*): morphological evaluation / M.N. Brand, R.D. Lineberg // American journal of botany – 1992. – V. 79 (6), – P. 618–625.
177. Benson E.E. In vitro plant recalcitrance: An introduction / Erica E. Benson // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2000. – V.6. – P. 141–148
178. Benson E.E. Free radicals in stressed and aging plant tissue cultures / E. E. Benson // In: Rodriguez R. et al. (eds.) Plant Aging: Basic and Applied Approaches, Plenum Press, New York. – 1990. – P. 211-226.
179. Boonsuebsakul W. Seed production using rapid multiplication technique / W. Boonsuebsakul // Southeast Asian Program for Potato Research and Development, Manila (Philippines). Completion of annual reports July 1991–June 1992: potato. Manila (Philippines). SAPP RAD. Sep 1992. – Vol. 1. – P. 255–257/
180. Çolgecen H. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb / H. Colgecen, U. Kosa, G. Toker // Turk J Biol. – 2011. – 35. – P. 513-520

181. Compton M. E1. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco / M. E. Compton, J. M. Koch // *In Vitro Cell Dev. Biol.*– 2001.–Plant 37.– P. 259-261.
182. Compton M. E. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM) on adventitious organogenesis / E. M. Compton, J. M. Koch // *In Vitro – Plant*– 1999.– 35(3).– P. 40-44.
183. Correll M. J. The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots / M. J. Correl, Z. J. Kiss // *Plant Cell Physiol.* 2005 Feb;46(2):317–23. Epub 2005 Feb 2.
184. Dubrovnaya O.V. Microclonal propagation of sugar beet plants with economically valuable characters / O. V. Dubrovnaya, I. I. Lyalko // VIII Internal. Conference “The Biology of Plant Cells *in vitro* and Biotechnology”.– Saratov, September 9–13, 2003.– Abstracts.– P. 86.
185. De Proft, M.P. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured *in vitro* / M.P. De Proft, L.J. Maene, P. P.c. Debergh // *Physiol. Plant.* – 1985. – Vol. 65. – P. 375-379.
186. Deng R. *In vitro* hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. / R. Deng, D.J. Donnelly // *Canadian–Journal–of–Plant–Science.* – 1993.– Vol. 73. – N. 4. – P. 1105-1113.
187. Egorova N. The micropropagation of some essential oil plant *in vitro* / N. Egorova, I. Stravtzeva, T. Latuschkina, L. Bugaenko, L. Kamenyok // *Abstr. Int. Conf. of Baltic States "Plant tissue culture: from theory to practice".* – Salaspils (Latvia). – 2004. – P. 74.
188. Ewald D. The influence of micrografting *in vitro* on tissue culture behavior and vegetative propagation of old European larch trees / D. Ewald, U. Kretzschmar // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1996. – V.44, – № 3. – P. 249–252.176.
189. Ewald D. Micropropagation of fast growing tree species as possible alternatives for agriculture Poznan / D. Ewald, G. Naujorks, V. Schneck // *Polen*, 07. – 08.09.–2005.– P. 35-41.
190. Frommel M.I. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum ssp. tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas sp.* / M. I. Frommel, J. Novak, G. Lasarovits // *Plant physiol.* – 1991. – Vol. 96. – P. 928-936.
191. Gilbert J.E. The use of antibiotics to eliminate latent bacterial–contamination in potato tissue–cultures / J. E. Gilbers, S. Shohet, P. D. S. Caligari // *Ann. of Appl. Biol.* – 1991. – Vol. 199.– № 1. – P. 113–120
192. George E.F. Plant Propagation by Tissue Culture / F. E. George // *In Practice.* – Exegetics Limited.–1993/1996. – 640 p.
193. Gupta P.K. Tissue culture of forest trees – Clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Horsk. By tissue culture / P. K. Gupta, A. F. Mascarenhas, V. Jagannathan // *Plant Sci. Lett.* –1981. – V. 20.–№ 3. – P. 195-201.
194. Hollis J.P. Bacteria in healthy potato tissue / J. P. Hollis // *Phytopathology.* 1951. – № 44. – P. 351–366.
195. Ivanova N. Biotechnology methods of propagation in ornamental pot plants *Anthurium andreanum* Lind and *Begonia Riger Elatior* / N. Ivanova // *Biotechnology Approaches for Exploitation and Preservation of Plant Resources.* – Yalta, 2002. – P. 32.
196. Kanayarat Supaibulwatana. Organogenesis and somatic embryogenesis from young flower buds of *Agapanthus africanus Hoffmans* / Supaibulwatana Kanayarat, Mii Masahiro // *Plant biotechnolodgy.*–1997 . – 14 (1).– P. 23-28.

197. Kaeppler S.M. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants / S.M. Kaeppler, H. F. Kaeppler, Y. Rhee // *Plant Molec.Biol.* – 2000. – T.43 – P. 179-188.
198. Kozai T. Micropropagation under photoautotrophic condition / T. Kozai // *Micropropagation technology and application.* – Amsterdam, 1991. – P. 447-469.
199. Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System. – 2005. – 316 p.
200. Kumar K. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in - ex vitro conditions- A Reviews / K.Kumar, I.U.Rao // *J.Ornamental and Horticultural Plants.* - 2012. - №2. -P. 271-283.
201. Larkin P. J. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement / P.J. Larkin, W. R. Scowcroft // *Theor. Appl. Genet.* – 1981. – Vol.60. – P.197-214.
202. Lubomski M. Shoot multiplication and rooting of *Hosta sieboldiana* cv. Gold Standard using cultured shoot tips / M. Lubomski // *Acta Hort.* – 1989. – N 251. – P. 223-228.
203. Levy D. Propagation of potato by the transfer of transplants of in vitro proliferated shoot cuttings into the field / D. Levy // *Scientia–Horticulturae (Netherlands).* – 1988. – V. 36– N 3. – P. 165-171.
204. Laloue M. Characterization of an imine intermediate in the degradation of isopentenylated cytokinins by a cytokinin oxidase from wheat. / M. Laloue , J.E. Fox M. Bopp, B. Knoop and W. // *Abstracts of the 12th international conference on plant growth substances.* – 1985. – T. 23 Rademacher. - Heidelberg, 1985. P. 23.
205. Lumsden P.Y. Effect of mineral nutrition on the growth and multiplication of *in vitro* cultured plants / P. Y. Lumsden, S. Pryce, C. Leifert // *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology.* Ed. by H. Nijkamp. – Amstergam: Kluwer Acad. Publ.– 1990. – P. 108-113.
206. MacFaddin J.F., *Media for Isolation–Cultivation–Identification–Maintenance of Medical Bacteria* / J. F. MacFaddin // *Williams and Wilkins, Baltimore,* 1985.– P. 126-134.
207. Matuskina, O. Peculiarities of pear cultivars rootstock regeneration *in vitro* / O. Matuskina // *VIII International Pear Symposium.* – Italy. – 2000.
208. Mitrychenko A. Growth, transpiration and hormonal response of wheat seedlings to heat temperature stress / A. Mitrychenko, I. Teplova, R. Farhutdinov, S. Abramov, G. Kudoyarova // *11th Congress of FESPP Federation of European societies of plant physiology, Varna, Bulgaria, September 7–11, 1998,* p. 240.
209. Miyazaki J. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using Plant Preservative Mixture (PPMTM) / J. Miyazaki, B. M. Tan, S. G. Errington // *PCTOC.* –2010.–102(3).– P. 365-372.
210. Mok D.W. Cytokinin Metabolism and Action / D. W. Mok, M. C. Mok // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* –1997. –V. 52.– P. 89-118.
211. Motyka V. *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants: Proceedings of the International Symposium on Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants* / V. Motyka, M. Kaminek // *The Hague: SBP Academic Publishing.*– 1992.– P. 33-39.
212. Moreira, M.F. Anatomical aspects of IBA–treated microcuttings of *Gamphrena macrocephala* St.–Hil / M.F. Moreira, B. Appezzato–Gloria, L.B.P. Zaidan // *Braz. Arch. Biol. and Technol.* – 2000. – 43, №2.

213. Noe N. Influence of irradiance on *in vitro* growth and proliferation of *Vaccinium corymbosum* (highbush blueberry) and subsequent rooting *in vivo* / N. Noe, T. Eccher // *Physiologia – Plantarum* (Denmark). – 1994. – Vol. 91. – N 2. – P. 273–275.
214. Ortiz R. Adaptation to day length and yield stability of families from 4x x 2x crosses in potato / R. Ortiz // *Euphytica* (Netherlands). – 1991. – V. 56. – N2. – P. 187–195.
215. Paek K.Y. *In vitro* propagation of hosta using cultured shoot tips and somaclonal variability of regenerants / K. Y. Paek, H. S. Ma // *Acta Hort.* –1996. –N 440. – P. 576-581.
216. Pereira J.E.S. Identification / and antibiotic control of endophytic bacteria contaminants in micropropagated potato explants / J. E. S. Pereira, V. L. T. Mattos, G. R. D. Fortes // *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. – 2003. – Vol. 38.– № 7. – P. 827-834.
217. Pierik R.L.M. Rejuvenation and micropropagation M. L. R. Pierik // *Progress in Plant Cell and Mol. Biol. Proc. VII Int. Congr. Plant Tissue and Cell Cult.* (June 24-29, 1991, Amsterdam). – Amsterdam, 1990. – P. 91-101.
218. Pospíšilová J. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions / J. Pospíšilová, I. Tícha, P. Kadleck, D. Yaisel // *Biologia Plantarum*– 1999. – V42.– №4. – P.481-497.
219. Raphael P. IAA–induced adventitious root formation in green wood cutting of populus tremula and formation 2–indoline–acetyeasparatic acid a new metabolite of exogeneo usly applied IAA / P. Raphael // *Phisiol.Plant.*–1989.–V. 75.– P. 86-89.
220. Stead D. Bacterial diseases of potato: relevance to *in vitro* potato seed production / D. Stead // *Potato Res.* – 1999. – Vol. 42. – P. 449-456.
221. Short K.C. In vitro hardening of cultured cauliflower and chrysentemum plantlets to humidity / K.C. Short, J. Warburton, A.V. Roberts // *Acta Hort.* – 1987. – Vol. 212. – P. 329-334.
222. Wardle, K. Stomatal response of in vitro cultured plantlets. S. Response in epidermal trips of *Chrysanthemum* to environmental factors and growth regulators / K. Wardle, K.C. Short // *Biochem. Phisiol. Pflanzen.* – 1983. – Vol. 178. – P. 619.
223. Wareing P.F. Absciscic acid as a natural growth regulator / P. F. Waareing // *Phil. Trans. Roy. Soc. London. B.* –1978. –284. –P.483-498.
224. Weiss D. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones D. Weiss, N. Ori // *Plant Phisiol.*– 2007.– P.1443-1446.
225. <http://my.elvisti.com/upri/ukr/dev/selec.htm>
226. <http://www.plantcelltechnology.com/plant-preservative-mixture-ppm/>
227. <http://ru.wikipedia.org/wiki/Агапантус>
228. https://pidruchniki.com/77279/prirodoznavstvo/tipi_zhivlennya_roslin

СЛОВНИК НАЙБІЛЬШ ПОШИРЕНИХ ТЕРМІНІВ З МКРР

Автотрофне живлення – автотрофне живлення, яке забезпечує синтез органічних речовин із неорганічних, здійснюється завдяки фотосинтезу і мінеральному живленню.

Агар-агар – полісахаридний препарат, який добувають з деяких червоних і бурих морських водоростей. Складається з агарози і агаропектину. А.-а. – широко використовується як гелеутворювач.

Адаптація – 1. пристосування організмів до існування в нових, не зовсім придатних зовнішніх умовах; 2. Сукупність нових ознак, які забезпечують здатність організмів до виживання в певних умовах зовнішнього середовища.

Адвентивні бруньки – бруньки, що виникли з клітин і тканин у рослинах, які зазвичай їх не утворюють.

Акропетальний транспорт — транспортування речовин у напрямі до апікальних меристем.

Андрогенез — процес утворення рослини з мікроспори чи пилкового зерна, або внаслідок гаметичного ембріогенезу, чи з утворенням калюсу.

Апікальне домінування — пригнічення росту бічних бруньок пагона за наявності апікальної (термінальної) меристеми.

Атрагуєча здатність — спроможність активувати транспорт поживних речовин до органа з найбільшою концентрацією фітогормонів-стимуляторів (ауксини, гібереліни, цитокініни, брассиностероїди).

Адвентивні органи, придаткові органи – органи рослин, які походять не з ембріональних тканин точки росту, а зі старіших частин рослини й розвиваються в незвичних місцях. До А. о. належать придаткові (адвентивні) бруньки, що виникають на міжвузлях, коренях, листках, та придаткові корені, які розвиваються на стеблах і листках. Здатність рослин утворювати А. о. використовують у разі вегетативного розмноження (живцювання, розмноження відростками, пагонами).

Аеропоніка – вирощування рослин без ґрунту чи його замітника. Рослини забезпечують поживними речовинами, періодично сприскуючи корені розпилим поживним розчином.

Акцептор – той, що приймає.

Акропетальний транспорт – транспортування речовин у напрямі до апікальних меристем.

Антиген – молекула, яка здатна після введення в організм хребетних ініціювати імунну реакцію утворення *антитіл*, що взаємодіють з речовиною, яка зумовила утворення антитіла.

Антисептик – будь-яка речовина, що перешкоджає росту мікроорганізмів, зокрема бактерій. На відміну від антисептиків, сполуки, які викликають загибель мікророорганізмів, називаються дезінфікуючими або бактерицидними (фунгіцидними) засобами. Багато речовин залежно від концентрації, часу дії, температури та інших умов мають ті чи інші властивості, тому в ужитку ці терміни використовують як синоніми. Проте, антисептиками обробляють рослинні об'єкти та предмети, що їх оточують (інструмент і т.д.), не запобігаючи їх небезпеці для живих тканин, а дезинфікуючими засобами обробляють неживі об'єкти. Повне знищення всіх мікроорганізмів та їх спор називається *стерилізацією*.

Антитіло – білкова молекула, що належить до імуноглобулінів, синтезована клітинами імунної системи хребетних у відповідь на введення *антигена* і здатна до специфічної взаємодії з ним.

Апекс – частина бруньки, ростовий центр пагона. Завдяки його діяльності формуються первинні тканини і зачатки всіх органів. А. властиві як гістогенні, так і органогенні процеси.

Апікальне домінування – пригнічення росту бічних бруньок пагона за наявності апікальної (термінальної) меристеми.

Асептика (грец. *α* – не і *σηπτικός* – гнійний) – сукупність заходів, спрямованих на попередження інфікування збудниками інфекції (бактерії, грибки). середовища, рослинних об'єктів та все, що їх оточує.

Атрагуєча здатність – спроможність активувати транспорт поживних речовин до органа з підвищеною концентрацією фітогормонів (ауксини, гібереліни, цитокініни, брассиностероїди).

Ауксини – фізіологічно активні речовини переважно індолевої групи, які утворюються в клітинах рослин і стимулюють їхні ростові й формотворчі процеси (напр., індолілоцтова кислота стимулює ріст відрізків колеоптилів, стебел, листків, утворення з живців рослин).

Брунька – зачаток пагона, що перебуває в стані відносного спокою. Складається із зачаткового стебельця, яке закінчується точкою росту, й зачатковими листками (листова або вегетативна брунька), зачатковими квітками або суцвіттями (квіткова брунька), або тими й іншими (змішана). Ззовні зимуючі бруньки вкриті твердими лусочками, які виділяють смолисті речовини (тополя, каштан), або волосками (верба), які захищають бруньки від дії холоду й висихання. Розрізняють Б. верхівкові (містяться на верхівці пагона) та бічні (пазушні, у пазухах листків). Додаткові або адвентивні бруньки на будь-якій частині рослини сприяють відновленню рослини та беруть участь у вегетативному розмноженні.

Вегетативне розмноження – нестатеве розмноження, за якого новий організм утворюється із частини материнського. Рослини розмножуються за допомогою вегетативних органів або їх частин. Усі форми В. р. можна поділити на дві основні групи: розмноження, яке відбувається в природі відчленуванням пагонів, кореневищами, бульбами, цибулинами, вусами, батогоми без втручання людини, і штучне – під впливом спрямованої діяльності людини: бульбами, цибулинами, кореневищами, поділом кущів, живцями, щепленням тощо.

Вегетативні органи – органи рослин, які функціонально підтримують індивідуальне життя організму і не беруть участі в генеративному розмноженні.

Віруси – інфекційні агенти неклітинної природи, яким властивий паразитизм у середині клітини. Вони дуже малих розмірів, мають відносно простий хімічний склад і структурну організацію.

Гелеутворювач (загушувач) – речовина, яка застосовується для надання середовищу густої желеподібної консистенції, але є хімічно нейтральною. Найчастіше як Г. у біотехнологічних дослідженнях використовують агар-агар – препарат, який отримують із морських водоростей. Залежно від його концентрації відрізняють “тверді” і “напіврідкі” середовища.

Генетична модифікація – метод за допомогою якого змінюються або додаються гени. Генетична модифікація передбачає вбудовування або зміну генів організму, результатом чого стає поява потрібної ознаки.

Гормональна система рослин – регуляторний комплекс, фітогормони, їх рецептори і вторинні посередники.

Гормональний статус – співвідношення між фітогормонами, головним чином стимуляторної та інгібіторної дії, притаманні певному стану рослин.

Гормон-рецепторний комплекс – поєднання гормону та білкового рецептора, перший необхідний крок в реалізації дії фітогормонів.

Гетеротрофний – організми, які використовують як джерело вуглецю екзогенні органічні речовини, що одночасно є для них джерелами енергії. У процесі онтогенезу в усіх рослин є період, коли організм використовує для своєї життєдіяльності раніше синтезовані та відкладені про запас органічні речовини – проростання насіння, бульб, цибулин, ріст і розвиток бруньок та ін. У рослини є також органи, для яких характерний гетеротрофний тип живлення, наприклад, це кореневі системи, плоди, насіння. У темновий період живлення рослин теж гетеротрофне [228].

Гібереліни – природні регулятори росту рослин, які прискорюють їхній ріст і цвітіння. Найбільше Г. зустрічається у частинах стебел, які ростуть.

Гіпергідратація (вітрифікація) – стан організму, що характеризується надмірним вмістом в окремих частинах або у всьому організмі води. Вона являє собою форму порушення водно-сольового метаболізму). В біотехнології це явище ще називають як вітрифікація.

Гормони – біологічно активні речовини, що виробляються в організмі спеціалізованими клітинами або органами і здійснюють цілеспрямований вплив на діяльність інших органів і тканин.

Дедиференціювання – перехід спеціалізованих клітин, що не діляться, до проліферації і неорганізованого калюсного росту.

Дезінтеграція – розпад, розділення цілого на складові частини.

Деконтамінація – знищення патогенної мікрофлори.

Детергенти – поверхнево активні речовини.

Детермінація розвитку – набуття клітиною, органом або організмом стану готовності до розвитку по визначеному шляху, що одночасно супроводжується обмеженням можливостей розвитку в інших напрямках. У період детермінації розвитку створюються необхідні внутрішні умови для наступної морфологічної реалізації нового напрямку розвитку.

Диференціювання – комплекс процесів, що призводять до відмінностей між дочірніми клітинами, а також між материнськими і дочірніми клітинами. Проявляється морфологічними, фізіологічними, біохімічними змінами клітин. Диференціація клітин виникає завдяки тому, що різні клітини мають активними різні типи генів. При цьому змінюється не лише генетичний, а й епігенетичний профіль клітин.

Донор – той, що віддає.

Екзогенний – зовнішнього походження, елемент живлення, біологічно активна речовина, процес, які надходять в рослинний об'єкт зовні.

Ендогенний – внутрішнього походження, речовина, процес, які викликається внутрішніми причинами.

Експлант (експлантат) – фрагмент тканини або органа, що використовується для вирощування *in vitro* самостійно, для одержання первинного калюсу або інших біотехнологічних маніпулювань.

Експресія гена – прояв генетичної інформації, що записана в гені у вигляді рибонуклеїнової кислоти, білка, фенотипової ознаки.

Ембріоїди – специфічне угруповання клітин, яке може покласти початок новому організму.

Ендофітні організми – це мікроскопічні організми, пристосовані до існування всередині тканин рослин, і беруть участь у їх життєвому циклі, не спричиняючи шкоди рослинам. Е. о. постачають рослинному партнеру мінеральні та органічні елементи живлення, впливають на розвиток рослин власними гормонами, активують захисну систему проти дії несприятливих зовнішніх чинників різної природи.

Епігенетичні варіації – фенотипові вираження активності генів, що успадковуються в поколіннях клітин. Від мутацій і соматональних варіантів відрізняються тим, що не зберігаються в циклі клітина-рослина-клітина, оскільки є зміною фенотипу особин без зміни генотипу.

Живець – відокремлена від материнського організму частина пагону або кореня, призначена для вегетативного розмноження. Розрізняють Ж. стебловий, листковий і кореневий.

Живцювання – один із способів вегетативного розмноження рослин за допомогою живців. Живці вкорінюють у ґрунті, піску, та на штучних субстратах або живильних середовищах.

Імуноферментний аналіз (ІФА) – процес утворення кон'югату відповідного антитіла і ферменту та наступного приєднання отриманої комплексної сполуки до антигена.

Інгібітор – деякі гормони та інші хімічні сполуки, що гальмують активність окремих ферментів або ферментних систем.

Індукція – виникнення процесів розвитку у певній частині клітин, де в цей час утворився якийсь продукт, який почав поширюватися в оточуючі клітини.

Калюс – недиференційована тканина. У природних умовах розвивається на ранових поверхнях, в *in vitro* за культивування окремих клітин або шматочків тканин.

Клон – сукупність клітин або організмів, які походять від спільного предка шляхом безстатевого розмноження.

Клонування – набір методів і прийомів, які застосовуються для виділення і розмноження нестатевим шляхом однорідних фрагментів ДНК, клітин або організмів, що є точними копіями спільного предка.

Конус наростання – верхня конусоподібна частина осьових органів (стебла, кореня), що складається з первинної твірної тканини – апікальної меристеми. За рахунок поділу клітин К. н. закладаються листки у вигляді меристематичних горбиків.

Культивування – вирощування в лабораторних умовах на живильному середовищі.

Культура експлантів – інкубація в стерильних умовах на поживних середовищах фрагментів або органів рослин.

Культура меристем – асептичне вирощування на поживних середовищах ізольованого із апексу або пазушної бруньки пагону конусу наростання з одним або двома листковими примордіями.

Культура тканин – метод збереження життєздатності тканин або цілих органів чи окремих клітин поза організмом *in vitro*.

Культура калюсних тканин – вирощування тривалою пересадкою культури калюсів, що виникли шляхом дедиференціювання і проліферації клітин, тканин, органів рослин.

Лінія – культура, яка виникла із штаму, експланта шляхом селекції або клонування і має специфічні маркерні ознаки.

Меристема – твірні, недиференційовані клітини, що здатні до активного поділу і з яких утворюються всі постійні тканини організму. У рослин виділяють декілька типів меристем – апікальні (недетерміновані), детерміновані та інтеркалярні (розміщені між ділянками постійних тканин, наприклад, при основі міжвузля злаків).

Мікрофлора – сукупність видів мікроорганізмів, які знаходяться в певному середовищі.

Мікробульби – бульби картоплі, отримані за певних умов *in vitro*. Їхній розмір може бути в діаметрі від 4 мм. М. – цінний матеріал для отримання еліти на основі біотехнологічного методу.

Мікроклональне розмноження рослин – отримання *in vitro* нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичних вихідній із метою прискореного розмноження цінного матеріалу.

Мікроцибулини – цибулини часнику, тюльпана, гіацинта та інших цибулькових культур культивованих *in vitro*.

Міксотроф – організм, який отримує поживні речовини за рахунок фотосинтезу та наявних у середовищі органічних речовин.

Мінеральна основа живильного середовища – макро- і мікроелементи мінерального живлення рослин, що додаються в штучні живильні середовища для оптимізованого живлення за асептичного культивування рослин.

Морфогенез – процес формування росту і розвитку органів (органогенез), тканин (гістогенез) і клітин (цитогенез або клітинне диференціювання).

Нативні (природні) умови – комплекс факторів та їх прояв, аналогічний природному.

Наповнювачі живильних середовищ – речовини, які використовуються для створення умов вертикального розміщення живців, або фіксування експлантів на поверхні середовищ чи необхідній глибині, у пробірці або іншій культуральній ємкості із середовищем. Використовують модифікований крохмаль, картопляний екстракт, синтетичний агар (пластагар), поліакриламідні гелі (біогелі).

Органогенез – процес утворення в калюсних масах клітин, що ростуть неорганізовано, зародків органів (коренів і пагонів).

Пасаж – 1. Переніс клітин, органів з одного середовища на інше з метою їх адаптації. 2. Переніс вірусу або іншого патогена від одного господаря до іншого з метою ослаблення останнього.

Поживні середовища – рідкі або тверді середовища, завдяки використанню яких в лабораторних умовах вирощують біологічні об'єкти.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – вибірковий синтез *in vitro* великої кількості копій малого фрагмента матричної ДНК. ПЛР дозволяє ампліфікувати будь-які послідовності ДНК. Використовують метод для секвенування, молекулярної ДНК-діагностики, картування генів тощо.

Примордій – зачаток того чи іншого органа рослини без морфологічних ознак диференціації. П. складається із групи однорідних меристематичних клітин і здебільшого має форму пуп'янка або валика (напр., П. листка, бруньки, чашолистиків, пелюсток, плодолистиків, тичинок).

Постасептична адаптація – адаптація матеріалу, вирощеного в стерильних умовах, до умов *in vivo*.

Прокаріоти – вірусні частинки, бактеріальні клітини, які, на відміну від еукаріот, не мають ядер.

Проліферація – збільшення кількості клітин шляхом мітотичного ділення. Зниження П. може бути непрямим доказом старіння клітин в організмі.

Регенерант – рослина, що виникла в результаті морфогенезу у культурі ізольованих тканин (клітин) рослин.

Регенерація – відновлення організмом втрачених або ушкоджених частин тіла. Регенерація в біотехнології – це явище відновлення цілої рослини і її частин. Під час культивування регенерація може відбуватися різними шляхами: пряма регенерація із культур меристем, верхівкових пагонів і вузлів та непряма із проміжною стадією через культуру калюсів та ембріодів.

Регулятори росту рослин (PPP) – фізіологічно активні речовини, які стимулюють або гальмують проходження фізіологічних процесів. Можуть мати природне або штучне походження. У рослинних організмів представниками Р. р. р. є фітогормони.

Резистентність організму – стійкість організму до дії фізичних, хімічних і біологічних агентів, які викликають паталогічний стан.

Реінфекція – повторне інфікування оздоровленого матеріалу.

Ризогенез – утворення у рослин або їх частин коріння.

Рослина-донор експлантів – рослина з якої ізолюються сегменти – експланти.

Сахароза, буряковий цукор, тростинний цукор – вуглевод з групи дисахаридів. Найпоширеніший у природі цукор рослинного походження. Безбарвні кристали солодкі на смак, добре розчиняються у воді. В біотехнології використовують як штучне джерело вуглеводнів, додаючи від 10 до 80 г на 1 л поживного середовища.

Світловий режим рослин – умови освітлювання рослин. Джерелом освітлення є природна сонячна радіація і штучні електроосвітлювальні прилади. С. р. р. характеризується: інтенсивністю випромінювання, спектральним складом світла, тривалістю денного освітлення, співвідношенням дня і ночі, а в умовах штучного освітлення рослин – співвідношенням періодів освітлення і затемнення. Однобічне освітлення зумовлює вигинання рослин до світла і відповідну орієнтацію листків. Рівномірне об'ємне освітлення сприяє утворенню дуже гіллястих, добре облиствлених рослин; верхнє освітлення стимулює посилений ріст рослин у довжину за незначної гіллястості.

Середовище живильне – розчин для вирощування ізольованих клітин, тканин, органів рослин у культурі *in vitro*, що містить макро-, мікроелементи, а також цукор (як правило, сахарозу), вітаміни, регулятори росту (фітогормони). Буває рідким і агаризованим.

Сомаклональні варіації і варіанти – фенотиповий прояв у культурі клітин непостійності ядерних і органельних цитоплазматичних геномів. Від звичайних генних мутацій відрізняються більшою частотою виникнення і комплексністю змін (зміни в структурі генів, хромосом, геномів).

Соматичний ембріогенез – процес утворення зародкоподібних структур (ембріодів) *in vitro* в культурі тканин і клітин.

Сплячі бруньки – пазушні бруньки дерев і кущів, які тривалий час перебувають у стані спокою, тобто з них не утворюються пагони відразу після їх закладання, а лише через кілька років (коли ушкоджується стебло). Це використовують для штучного формування крони та за вегетативного розмноження.

Стерилізація – знищення мікроорганізмів з використанням фізичних методів (висока температура, високий тиск, опромінення), хімічних речовин.

Субкультивування – наступне культивування після першого вирощування клітин, тканин, рослин в лабораторних умовах на живильному середовищі.

Субстрат – середовища (напр., ґрунт, пісок, камінь, галька, тирса, перліт, вермикуліт, агар), на яких закріплені і зростають рослинні організми.

Суспензійна культура – вирощування окремих клітин або невеликих їх груп у завислому стані в рідкому середовищі при використанні обладнання, що забезпечує їх аерацію та перемішування.

Твірні тканини, меристеми – сукупність клітин із незавершеною диференціацією, внаслідок поділу яких утворюються всі постійні тканини рослинного організму. За походженням розрізняють первинні, що утворилися безпосередньо із зародка (конус наростання, прокамбій), і вторинні Т. т., що утворилися з постійних тканин (камбій, фелоген). За локалізацією розрізняють апікальну, латеральні, інтеркалярні та ранові Т. т.

Тканина – система клітинних структур та їх похідних, які мають загальне походження, будову, функції і характеризуються взаємопов'язаними морфологічними властивостями. Т. становить морфологічну основу органа.

Тотипотентність – властивість клітин реалізувати генетичну інформацію, що забезпечує їх диференціацію. Т. соматичних клітин реалізується у культурі тканин рослин.

Трансплант – частина калюсної тканини, що використовується для перенесення на свіже середовище.

Фенотип – сукупність ознак, що визначаються генотипом та умовами вирощування.

Ферменти – біологічні каталізатори, більшість з яких є розчинними глобулярними білками.

Фітогормони – органічні, відносно низькомолекулярні сполуки за допомогою яких відбувається взаємодія клітин, тканин і органів рослин. У малих кількостях необхідні для запуску та реалізації фізіологічних програм, спричиняють ростові або формативні ефекти і не володіють дією добрив та гербіцидів. Загально визнаними є такі Ф.: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота, етилен.

Фотоперіодизм – реакція рослин на співвідношення світлового і темного періодів доби темпами онтогенезу.

Хелати (комплексоутворювачі) – речовини, що утворюють з металами комплексну сіль, у якій вони закріплені за всіма валентностями. Деякі метали, наприклад, залізо та інші за високих значень рН можуть бути доступні рослинам і пересуваються в ній у хелатній формі.

Штам – культура, що утворилась після першого субкультивування. Складається з багатьох клітинних ліній, які виникли із клітин первинної культури.

Ювенільні форми рослин – форми молодих органів, що характеризують рослину до досягнення нею дорослого стану (наприклад, молоді листки конюшини й суниць – прості, а не трійчасті. Ювенільні органи у разі введення їх в культуру *in vitro* мають у більшості рослин вищі регенераційні здібності.

Ex vitro – організми (рослини), вилучені з культури тканин та пересажені в ґрунт або теплиці

In vitro (лат. *in vitro* — «у склі») — це техніка виконання експерименту, оздоровлення, клонування інших маніпуляцій у ізольованих асептичних умовах при контрольованому середовищі, температурі, вологості та інших факторах життєдіяльності.

ПОДГАЄЦЬКИЙ Анатолій Адамович

МАЦКЕВИЧ Вячеслав Вікторович

ПОДГАЄЦЬКИЙ Анатолій Анатолійович

**ОСОБЛИВОСТІ
МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ
ВИДІВ РОСЛИН**

Редактор - Грушко О.О.
Комп'ютерна верстка Мацкевич В.В.

Формат 60x84/8 (А4). Умовн. друк. арк. 22,5. Тираж 500 прим.

Білоцерківський національний аграрний університет
РВІКВ, Сектор оперативної поліграфії БНАУ
площа Соборна, 8/1, м. Біла Церква