

Н

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НУБІП України

06.07 – МКР. 375 «С». 2022.12.09. 05 ПЗ

НУБІП України

ХОРОЛЬСЬКИЙ СЕРГІЙ АНДРІЙОВИЧ

НУБІП України

НУБІП України 2022

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет Захисту рослин, біотехнологій та екології

У ДК 606.632:633.854.79

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету

Захисту рослин, біотехнологій

біорізноманіття

та екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

Екобіотехнології та

Коломієць Ю. В.

(підпис)

(ПІБ)

20 р.

Кваско О. Ю.

(підпис)

(ПІБ)

20 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Мікроклональне розмноження рослин чаю китайського (*Camelia sinensis* L. Kuntze)»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Орієнтація освітньої програми Освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

(ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

в.о. зав. кафедри екобіотехнології

та біорізноманіття, к.б.н.,

Кваско О.Ю.

(підпис)

Виконав

Хорольський С. А.

(підпис)

КИЇВ – 2022

НУБІП України

Національний університет біоресурсів
і природокористування України

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

Кафедра

Освітній ступінь «Бакалавр»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

НУБІП України

2022 р.

ЗАВДАННЯ

НА ВИПУСКНУ

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

Хорольському/Сергію Андрійовичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Мікроклональне розмноження рослин чаю китайського (*Camelia sinensis* L. Kuntze)»

керівник роботи Кваско Олена Юріївна,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом НУБІП України від «26» жовтня 2022 р. № 150 «3»

НУБІП України

2. Строк подання студентом роботи 23.05.22

3. Вихідні дані до роботи: вихідні рослини чаю китайського, компоненти живильного середоша, розроблені протоколи проведення дослідження

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

1. Отримати асептичні рослини чаю китайського з використанням пазушних меристем як експлантів.

НУБІП України

2. Підібрати оптимальний склад живильного середовища для найбільш ефективного мікроклонального розмноження рослин чаю китайського

3. Оптимізувати склад середовища для укорінення *in vitro* пагонів чаю китайського.

НУБІП України

5. Консультанти розділів роботи

Розділ

Прізвище, ініціали та

Підпис, дата

НУБІП України

посада завдання видав завдання консультанта прийняв

Розділ 1

Лобова О.В., доцент

НУБІП України

Розділ 2 Кляченко О.Л., професор

Розділ 3 Коломієць Ю.В., професор

НУБІП України

НУБІП України

6. Дата видачі завдання 23 жовтня 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

НУБІП України

НУБІП України

№	Назва етапів	Строк виконання етапів роботи	Примітка
з/п	випускної бакалаврської роботи		
1	Написання огляду літератури	Жовтень- листопад 2021	
2	Отримати асептичні рослини чаю китайського з використанням пазушних меристем як експлантів	Листопад- грудень 2021	
3	Підібрати оптимальний склад живильного середовища для найбільш ефективного міроклонального розмноження рослин чаю китайського	Січень-квітень 2022	
4	Оптимізувати склад середовища для укорінення in vitro пагонів чаю китайського	Квітень-травень	
5	Написання та оформлення кваліфікаційної роботи	Вересень 2022	
6	Підготовка роботи до захисту	жовтень 2022	

Студент

Хорольський С. А.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

Кваско Д. Ю.

(підпис)

(прізвище та ініціали)

НУБІП України

РЕФЕРАТ

Дипломна робота: 42 сторінки, 11 рисунків, 48 джерел.

НУБІП України

Метою дослідження є розробка технології мікроклонального розмноження рослин чаю китайського *Camelia sinensis* L. Kuntze.

Завдання роботи:

НУБІП України

1. Отримати асептичні рослини чаю китайського з використанням пазукових меристем як експлантів

2. Підібрати оптимальний склад живильного середовища для найбільш ефективного мікроклонального розмноження рослин чаю китайського

НУБІП України

3. Оптимізувати склад середовища для укорінення *in vitro* пагонів чаю китайського.

Об'єкт дослідження: мікроклональне розмноження рослин чаю китайського *Camelia sinensis*

НУБІП України

Предмет вивчення: рослини чаю китайського *Camelia sinensis*

Матеріали і методи досліджень:

- Біотехнологічні методи, методи культивування рослин *in vitro*
- Статистичні методи

НУБІП України

Актуальність дослідження обумовлена сучасним станом розвитку промислового використання чаю китайського *Camelia sinensis* на території

України та перспективи використання технології мікроклонального розмноження рослин для отримання великої кількості посадкового матеріалу

НУБІП України

за відносно короткий проміжок часу.

НУБІП України⁷

У першому розділі проведено загальний огляд виду *Camelia sinensis* L. Kuntze, умови вирощування та застосування культури. Зроблено огляд методів мікроклонального розмноження рослин та наведено його переваги у порівнянні з традиційними методами вегетативного розмноження.

НУБІП України

У другому розділі описано матеріали та методи дослідження.

У третьому розділі описано та проаналізовано основні результати роботи, проведено узагальнення отриманих даних, зроблено ґрунтовні

НУБІП України

висновки.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України⁸

ЗМІСТ

1. ВСТУП	6
2. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
2.1. Загальний опис виду <i>Camelia sinensis</i> L. Kuntze	9
2.2. Культивування рослин в умовах <i>in vitro</i>	12
3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	18
3.1. Введення в культуру <i>in vitro</i> рослин <i>Camelia sinensis</i>	18
3.2. Оптимізація складу живильного середовища для мікроклонального розмноження та укорінення рослин чаю китайського	20
4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	22
4.1. Отримання асептичних рослин чаю китайського	22
4.2. Мікроклональне розмноження рослин чаю китайського	24
4.4. Укорінення <i>in vitro</i> пагонів чаю китайського	31
ВИСНОВКИ	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	36

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України⁹

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАП — бензіламінопурип
НУБІП України

ЮК — індолілоцтова кислота

ІМК — індолілмасляна кислота

ГК — гіберелінова кислота
НУБІП України

НОК — нафтілоцтова кислота

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

1. ВСТУП

В останні роки значно підвищився інтерес до методів культури рослин *in vitro*. Суть методу полягає у вирощуванні чистих культур рослин у стерильних умовах. Даний метод заснований на тотипотентності рослинних клітин – унікальній властивості, здатності рослинної клітини за певних умов вторинно диференціюватись та під впливом певних зовнішніх факторів обирати той чи інший шлях морфогенезу [22]. Цей метод використовуються в фундаментальних дослідженнях фізіології, цитології, генетики, селекції, а також для практичного використання у клітинних технологіях.

Рослини чаю китайського (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) належить до родини. З даної рослини виготовляють найстаріший у світі безалкогольний напій, що містить кофеїн, з чим і її пов'язане господарське значення. Чай в основному споживається у формі ферментованого чаю або чорного чаю, але неферментованого або зеленого чаю та менш відомого також доступний напівферментований чай або чай улун. Вони відрізняються способом виготовлення, хімічним складом, зовнішнім виглядом і органолептичними характеристиками [41].

Відомо, що у природі відбувається ауткросинг чаю, і вибрані елітні генотипи розмножуються вегетативно та випускаються як клонові сорти.

Хоча звичайне вегетативне розмноження чаю, використання живців з одним вузлом є порівняно простим у виконанні, проте лише одна рослина може бути вирощена з одного черенка, і це займає від 10 до 12 місяців, щоб підготуватися до посадки у відкритий ґрунт. Для промисловості клонових плантацій потрібно від 11 000 рослин до 15 000 рослин для посадки на одному гектарі землі та щороку потрібна величезна кількість клонових рослин [40]. У зв'язку з цим практично стає важко виготовити таку велику кількість клонових рослин протягом короткого періоду. За цих обставин мікроклональне

НУБІП України

розмноження набуває широкого розповсюдження для швидкого та масового розмноження чайних клонів.

Вегетативне розмноження є ефективним методом отримання посадкового матеріалу, проте воно обмежене кількома факторами для рослин чаю китайського та інших споріднених видів, зокрема:

- 1) повільніші швидкості розповсюдження;
- 2) відсутність відповідного посадкового матеріалу через зимовий спокій і посуху в деяких районах вирощування чаю;
- 3) бідний приживлюваність на розсаднику через погане коренеутворення деяких клонів;
- 4) залежна від сезону здатність укорінення живців[41].

Усі ці недоліки можна подолати шляхом мікроклонального розмноження *in vitro*, особливо це важливо для деревних багаторічних рослин, таких як чай китайський.

Таким чином, технологія мікроклонального розмноження є ідеальним вибором для вирішення проблем, пов'язаних зі звичайним традиційним поширенням деревних рослин, зокрема чаю китайського. Крім того, завдяки швидкій швидкості розмноження, він є перспективним методом для новостворених сортів чаю, які користуються високим попитом у промисловості і, отже, потребують постачання у великій кількості протягом

короткого часу.

Відповідно, актуальність дослідження обумовлена сучасним станом розвитку промислового використання чаю китайського на території України та перспективи використання технології мікроклонального розмноження рослин для отримання великої кількості посадкового матеріалу за відносно короткий проміжок часу.

НУБІП України

НУБІП України¹²
Метою дослідження є розробка технології мікроклонального розмноження рослин чаю китайського. Для досягнення мети було визначено наступні завдання:

НУБІП України
1. Отримати асептичні рослини чаю китайського з використанням пазушних меристем як експлантів.

2. Підібрати оптимальний склад живильного середовища для найбільш ефективного мікроклонального розмноження рослин чаю китайського

НУБІП України
3. Оптимізувати склад середовища для укорінення *in vitro* пагонів чаю китайського.

Об'єкт дослідження: мікроклональне розмноження рослин чаю китайського

НУБІП України
Предмет вивчення: рослини чаю китайського

Матеріали і методи досліджень:

- Біотехнологічні методи, методи культивування рослин *in vitro*
- Статистичні методи

НУБІП України
Структура та обсяг дипломної роботи. Дипломна робота складається

зі вступу, 3-х розділів, висновків, списку використаних джерел, що включає 48 найменувань. Робота викладена на 42 сторінці машинописного тексту.

НУБІП України
Фактичний матеріал дипломної роботи подано у вигляді 11 рисунків.

НУБІП України

НУБІП України¹³

2. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

2.1. Загальний опис виду *Camelia sinensis* L. Kuntze

Camelia sinensis L. Kuntze - чай китайський, рослина родини *Theaceae*.

Представляє собою вічнозелений чагарник або невелике дерево заввишки до 10 м і більше (у разі насіння дерев) з відгалуженими гілками.



Рис. 2.1.1. Рослини чаю китайського *Camelia sinensis* L. Kuntze

Листя шкірясте чергове, овальне або подовжено-овальне, до верхівки звужене, короткочерешкове, зверху темно-, знизу світло-зелене, довжиною 5-7, шириною 3,5-4 см, в молодому стані злегка сріблясто-опушене. Край листя зубчастий. У м'якоті листя є гіллясті опорні склереїди.

Квітки запашні, поодинокі або сидять по 2-4 у пазухах листя. Приквітки та квітконітики розташовані по спіралі. Чашка зростнолиста з п'яти-семи нашолистків, майже округлих, що залишаються при плоді, віночок у поперечнику 2,5-3 см, що опадає після цвітіння, з п'яти-дев'яти білик з жовтувато-рожевим відтінком пелюсток, в основі зрощених між собою та чашкою. Тичинки у двох колах: зовнішні зростаються тичинковими нитками та приростають до пелюсток, внутрішні вільні, пилковики дрібні, яйцеподібні. Рісцевий ценокарпний, зі стовпчиками, що зрослися до середини.

НУБІП України

Плід - плоскага 3-5-стулкова дерев'яниста коробочка. Насіння округле, темно-коричневе, довжиною 10-13 мм, товщиною 1 мм.

Цвіте із серпня до пізньої осені. Плодоносить у жовтні – грудні.

Листя містить 9-36% дубильних речовин, серед них до 26% розчинних і до 10% нерозчинних, смолу, нуклеопротейди, що містять залізо та марганець. До складу розчинних дубильних речовин входять галокатехінгаллат, L-епіатехінгаллат, L-епігалокатехін, L-галлокатехінгаллат і L-епікатехін, вільна

галлова кислота та інші речовини. У листі знайдено також алкалоїди — кофеїн (1,5—3,5%), теофлін, теобромін, ксантин, аденін, гіпоксантин, параксантин, метилксантин, ізатин та інші органічні основи. Виявлені флавоноїди - кемпферол, 3-рамноглікозид кемпферолу, кверцетин, кверцитрин, ізокверцитрин, рутин та ін. [43]



Рис. 2.1.2 Плантація чаю китайського в м. Мукачево, Закарпаття, Україна

У стеблах, коренях та насінні містяться стероїдні сапоніни. У насінні 22-25% жирної олії, 30% крохмалю та стерини — стигмастерин і β , γ -ситостерин, до 8,5% білка. У листі є також кумарини, вітаміни — аскорбінова кислота

НУБІП України ¹⁵

(понад 0,230 %) тіамін, рибофлавін, піридоксин, філлохінон, нікотинова та пантотенова кислоти, ефірна олія.

НУБІП України

До складу ефірної олії зі свіжого неферментованого листа (вихід 0,007—0,014 %) входять (Z)-3-гексенол-1 (66 %), метиловий спирт, гексен-2-аль, ізомасляний та ізовалеріановий альдегіди, оцтова, пропіонова, масляна, капронова та пальмітинова кислоти, метиловий ефір саліцилової кислоти.

НУБІП України

Складові ефірної олії з чорного чаю: цитронеллол, гераніол, ліналоол, вторинний терпеновий спирт, бензиловий, фенілетиловий, бутиловий, ізобутиловий, ізоаміловий, гексиловий, октиловий і 3-метилбутиловий спирти, альдегіди, альдегіди, каприлова та пальмітинова кислоти та складні ефіри цих кислот.

НУБІП України

На території України рослини чаю китайського також вирощують у відкритому ґрунті. Так, на Закарпатті поблизу м. Мукачєво понад 70 років розташована найпівнічніша плантація чаю китайського. Ще у 1952-1954 роках Закарпатський регіон було визнано найбільш перспективним для вирощування даних рослин, планувалось надати до 1000 га землі під чайні плантації. Однак у 1959 році даний проект було закрито, сьогодні чайні плантації в Україні підтримуються локальними приватними фермерськими господарствами. Закарпатські селекціонери вивели особливий сорт чаю, який би міг витримувати клімат помірних широт, такі рослини сягають висоти близько 2 м.

НУБІП України

2.2. Культивування рослин в умовах *in vitro*

НУБІП України

У багатьох фундаментальних та прикладних дослідженнях використовується метод культури рослин *in vitro*. Цей метод представляє собою культивування ізольованих клітин, тканин, органів чи цілих рослин у стерильних умовах на штучних живильних середовищах [1]. Перевагою цього

НУБІП України

методу є можливість проведення досліджень із отриманням більш точних результатів незалежно від сезону. Культури тканин таких рослин мають ряд унікальних особливостей. По-перше, їх можна використовувати у вигляді культури недиференційованих клітин (калус), що зберігає здатність до синтезу вторинних метаболітів. По-друге, з'являється можливість успішної репродукції видів, природне поновлення яких в природі послаблене або викликає значні труднощі, а також стає можливим використання мінімальної кількості експлантів для отримання значної кількості рослин без порушення природних популяцій [20]. Використання цього методу також сприяє скороченню селекційного процесу за рахунок відбору безпосередньо в культурі *in vitro* [18].



Рис. 2.2.1. Напрямки використання культури рослинних клітин

НУБІП України

Як вже було сказано, рослини вирощують у стерильних умовах. Для забезпечення цієї вимоги рослинний матеріал перед посадкою на живильне середовище стерилізують. В якості вихідного матеріалу (експлантів) використовують насіння, фрагменти (або і цілі) листки, корені, а також бруньки. Одним із найбільш поширених способів є метод поверхневої стерилізації - знищення грибних і бактеріальних спор на зовнішній поверхні

НУБІП України

НУБІП України

експлант в без пошкодження внутрішніх тканин. В якості стерилізуючих агентів можуть виступати сполуки, що містять активний хлор, розчини сулеми, гідроген пероксиду тощо.

НУБІП України

Для отримання власне рослин чи культур клітин (або тканин) рослинний матеріал має бути перенесений на живильне середовище. Останнє представляє собою речовину або суміш речовин, що використовується для вирощування організмів в контрольовани умовах. Існує багато варіантів середовищ із різним складом, проте для рослинних клітин найбільш оптимальним вважається середовище Мурасиге і Скута.

НУБІП України

Культивування рослин *in vitro* лежить в основі мікроклонального розмноження, засноване на унікальній здатності ізольованих клітин та тканин регенерувати цілу рослину з окремих клітин (тотипотентність). Сьогодні розроблено декілька засобів так званого мікроклонального розмноження.

НУБІП України



Рис. 2.2.3 Біотехнологічна схема мікроклонального розмноження рослин

НУБІП України¹⁸

Першим способом мікроклонального розмноження є активація росту пазушних бруньок. Для цього експланта видаляється верхівкова меристема та поміщається на безгормональне живильному середовищі або живильне середовище з цитокінінами, що сприяє розвитку пазушних пагонів. Отримані у такий спосіб пагони вже можуть вирощуватись незалежно на живильному середовищі [26].

Ще одним способом мікроклонального розмноження рослин є стимулювання додаткових бруньок з тканин експланта. Таким чином рослини здатні відновити органи, які відсутні або навіть і регенерувати цілу рослину.

Отже такий спосіб мікроклонального розмноження має в основі здатність органів і тканин рослин формувати додаткові або адвентивні бруньки, які можуть активізуватись за певного складу живильних середовищ [26].

Наступним способом отримання великої кількості асептичних рослин є

соматичний ембріогенез, що представляє собою утворення соматичних зародків (ембріодів), які в більшості випадків з часом втрачають зв'язок з материнським організмом. Як правило, соматичні ембріоди проходять основні стадії формування, які відповідають стадіям розвитку зиготичних зародків. Утворення соматичних ембріодів може відбуватись безпосередньо з клітин тканин експланта (прямий ембріогенез). Рослина-регенерант, яка

розвинулась із соматичного зародка, є з самого початку цілісною рослиною, вона має пагін і корінь. В той же час регенеранти, які отримані статевим шляхом, не завжди мають власні корені [26].

До методів мікроклонального розмноження також належить регенерація рослин *in vitro* – відновлення цілого організму з його частини. При його використанні кількість рослин-регенерантів за рік зростає до мільйонів, тому і є найбільш привабливим з комерційної точки зору [26]. Так, коефіцієнт

НУБІП УКРАЇНИ

розмноження цибулин деяких сортів гіацинтів в умовах *in vitro* в 40 разів вище, ніж при розмноженні цих рослин звичайним способом. Показано, що

для рослини *Saintpaulia ionantha* на одному листовому диску діаметром 1 см

НУБІП УКРАЇНИ

можна отримати 37 ± 7 бруньок [27]. Також успішно регенерують та розмножуються *in vitro* такі роди рослин як *Peperomia* [3], *Chrysanthemum* [38], *Paulownia* [39], *Begonia* [40], а також деякі сільськогосподарські культури –

Helianthus annuus, *Beta vulgaris*, *Triticum aestivum*, *Solanum tuberosum* [1] тощо.

НУБІП УКРАЇНИ

Ефективність регенерації рослин *in vitro* значною мірою залежить від їх генотипу, а також складу поживного середовища (присутність тих чи інших макро- та мікроелементів, вітамінів, регуляторів росту).

Мікроклональне розмноження шляхом прямої регенерації пагонів *in vitro* безпосередньо тканинами експланта включає 2 етапи – регенерацію пагонів та їх укорінення. Даний спосіб мікроклонального розмноження дозволяє швидко та з меншими витратами отримати цілісні рослини-регенеранти.

НУБІП УКРАЇНИ

Першим етапом прямої регенерації є утворення пазушних пагонів. Основну роль при цьому відіграють регулятори росту, зокрема цитокиніни. Вони індукують розвиток *de novo* пазушних бруньок з експлантованих

НУБІП УКРАЇНИ

тканин. Різна інтенсивність процесів регенерації пагонів з цих тканин зумовлена різною активністю недиференційованих (меристематичних) клітин. Меристематичним тканинам властива здатність, яка зумовлює

НУБІП УКРАЇНИ

спрямованість транспорту речовин в рослині. Ця властивість зберігається і для меристематичних тканин в культурі *in vitro*. При цьому у відокремленому від рослини листку транспорт речовин відбувається з листкової пластинки в основу черешка. Це є однією з причин того, що регенерація пагонів відбувається в основі листкової пластинки. Важливим фактором, що впливає

НУБІП України

на індукцію пагонів безпосередньо з тканин експланта, є вік цих тканин.

Встановлено, що чим молодший вихідні тканини, тим більшою є здатність до регенерації. Разом з тим, іноді ефективна регенерація спостерігається із дорослих листків.

НУБІП України

Другим етапом отримання рослин шляхом прямої регенерації *in vitro* є укорінення отриманих пагонів.

Укорінення пагонів проводять двома способами:

НУБІП України

1) витримка пагонів протягом 2-24 год в стерильному концентрованому розчині ауксину (20-50 мг/л) і подальше їх культивування на агаризованому середовищі без гормонів;

НУБІП України

2) безпосереднє культивування пагонів протягом 3-4 тижнів на поживному середовищі.

Н

Таким чином, сучасна фітобіотехнологія має ряд методів отримання великої кількості рослин різних видів. Всі вони засновані на принципі тотипотентності рослинної клітини та здатності формувати фізіологічну відповідь на вміст екзогенних речовин у живильному середовищі.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

3.1. Введення в культуру *in vitro* рослин *Camelia sinensis*

Вихідним матеріалом для отримання асептичних рослин чаю китайського були однорічні пагони. Для стерилізації використовувалися верхівки пагонів, у яких було видалено листки з черешками якомога ближче до стебла, не пошкоджуючи пазушні бруньки. При цьому якомога більше щільно скручених листків навколо верхівки пагона були послаблені та видалені.

Експланти було попередньо промити в проточній воді протягом 20 хв.

Після того промиті експланти обробляли фунгіцидом Максим (діюча речовина флудиоксаніл, виробник Сінгента, Швейцарія), залишали протягом 2-3 годин у фунгіциді після чого промивали та піддавали подальшій стерилізації. Оброблені фунгіцидом експланти поміщали у 70%-ний розчин етанолу та інкубували протягом 3-5 хв. Після цього експланти переносили у 0,1% розчин сулеми (гідраргіум хлориду) та витримували протягом 20 хв. Потім експланти вимивали стерильною дистильованою водою тричі протягом 10 хв.

Простерилізовані у таких спосіб експланти культивували на агаризованому живильному середовищі Мурасиге та Скуга (МС) [22], доповненому 0,5 мг/л цитокініну 6-бензиламінопурину (БАП). Склад середовища Мурасиге та Скуга наведено у таблиці 3.1.1.

Підраховували ефективність введення в культуру *in vitro*, визначаючи відношення кількості експлантів, які залишились живими (дали початок новим асептичним пагонам), до кількості всіх простерилізованих експлантів (у

НУБІП України²²
 відсотках). Крім того, оцінювали відсоток стерильних неінфікованих експлантів до загальної кількості експлантів.

НУБІП України *Таблиця 3.1.1*
 Склад живильного середовища Мурасиге та Скуга

Компоненти	Вміст, г/л	Компоненти	Вміст, г/л
Макроелементи		Розчин хелатованого заліза	
NH_4NO_3	33	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	55.6
KNO_3	38	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	74.6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.4	Вітаміни	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.8	Тіамін В6	0,1
KH_2PO_4	3.4	Піридин	0,1
Мікроелементи		Нікоїнова кислота	0,1
KI	1.7	Кальцій пантотенат	0,1
H_3BO_3	1.24	Біотин	0,001
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.4	Монозит	10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.7	Інші компоненти	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5	Сахароза	30
$\text{C}_4\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.05	Агар-агар	6.5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05		

НУБІП України

3.2. Оптимізація складу живильного середовища для мікронального розмноження та укорінення рослин чаю китайського

Для оцінки впливу складу живильного середовища на мікрональне розмноження рослин чаю китайського було використано середовище Мурасиге та Скута (МС) та середовище МС зі зменшеним вдвічі вмістом макроелементів (1/2 МС), доповнене такими регуляторами росту як БАП у концентраціях 0; 3 та 5 мг/л; гіберелінової кислоти (ГК) у концентраціях 0; 2,5 та 5 мг/л; індолілмасляної кислоти (ІМК) у концентраціях 0; 0,1; 0,2; 0,3 мг/л. Вміст сахарози складав 3 % (мас./об.), рН середовища складала 5,8. Автоклавовання середовища проводили протягом 20 хв при 120 °С і 150 кПа.

Експеримент проводили в 5 повторностях, кількість експлантів на варіант/середовища складала 5 на кожну культуральну пробірку. Вміст середовища у пробірці сягав 20 мл, кожна пробірка була закрита поліпропіленовою кришкою.

Рослини культивували за умов відносної вологості від 60 до 65 %, температури 24 °С під люмінесцентним світлом, 16-ти годинному фотоперіоді.

Спостереження за процесом утворення пагонів проводили як кількісно, так і якісно. Якісні спостереження проводили кожні 5 дб з використанням фотографій, що демонстрували розвиток рослин з моменту його посадки на живильне середовище до формування повноцінних пагонів. Кількісні спостереження включали оцінку швидкості утворення пагонів, їх ніпкості, висоту пагонів. Отримані дані були оброблені статистично, визначено середньоквадратичне відхилення на рівня надійної ймовірності 0,05.

Для оптимізації умов укорінення було використано живильні середовища з різним вмістом ауксинів, зокрема, нафтілоцтової (НОК), індолілмасляної (ІМК) та індолілоцтової кислоти (ІОК). Контролем слугував варіант середовища без додавання регуляторів росту. Пагони піддавали дії

НУБІП України²⁴

ауксину протягом 10 днів, а потім переносили на середовище, вільне від ауксину. Пагони культивували також на середовищах з різним вмістом

сахарози — 0-400 мМ (з кроком 50 мМ) та різною інтенсивністю освітлення -

Н [0,5, 12, 20, 30, 40, 50, 75, 100 мкмоль\м² с. Пагони також культивували з різних температур, зокрема від 5 до 50 °С з кроком 5 °С]

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1. Отримання асептичних рослин чаю китайського

Відомо, що основною проблемою при введенні в культуру *in vitro* деревних рослин (в тому числі й чаю китайського) є виділення фенольних сполук експлантами та бактеріальна контамінація експлантів. Вихідний матеріал для роботи часто отримують з рослин, вирощених у полі, тому вони є значно забрудненими різноманітними епіфітними та ендоефітними мікроорганізмами. Це спричинює значні втрати матеріалу на кожному з етапів мікроклонального розмноження. Рівень забрудненості може змінюватись залежно від сезону збирання експлантів. Так, рівень забрудненості експлантів може бути мінімізований, якщо збір пагонів був на початку сезону, коли температура повітря була відносно низькою, а рослини були молодими. Рівень забруднення змінювався залежно від сезону збору експлантагу, та може бути мінімізований через збір експлантів на початку першого сезонного змиву, коли температура повітря була відносно низькою, і рослини були молодими та сильнорослими [30].

Результати наших досліджень показали, що застосована технологія стерилізації експлантів для отримання асептичних рослин чаю китайського, дозволяє отримати стерильні (вільні від бактеріальної та грибової інфекції) з ефективністю 30-40 %.

Рослини *C. sinensis* під час культивування *in vitro* здатні виділяти в середовище значну кількість фенольних сполук, які піддаються ферментативному окисленню з утворенням токсичних для пагонів сполук. Такі токсичні сполуки знижують рН живильного середовища [41]. Виділення фенольних сполук в середовище можна оцінити за зміною його кольору на коричневий. Додавання в живильне середовище активованого вугілля у концентрації 3 г/л дозволяє суттєво знизити негативний вплив фенольних

НУБІП України ²⁶
спожук на життєздатність пагонів і значно підвищити відсоток виживаючі
експлантів при вирощування рослин чаю китайського в умовах *in vitro* [44].

В даній роботі для вирощування асептичних пагонів чаю
китайського було використано середовище Мурасиге та Скуга, доповнене 0,5
НУБІП України
мг/л БАП та 3 мг/л активованого вугілля.



Н
Н
Рис. 4.1.1. Асептичні рослини чаю китайського на живильному
середовищі Мурасиге та Скуга, доповненому 0,5 мг/л БАП та 3г/л
активованого вугілля

НУБІП України
Отже, послідовна обробка експлантів (пазушних меристем) фунгіцидом,
70% етанолом, 0,1% розчином сулеми, а також культивування експлантів на
живильному середовищі Мурасиге та Скуга з додаванням 0,5 мг/л БАП та 3
НУБІП України
г/л активованого вугілля призводить до отримання асептичних пагонів чаю
китайського з ефективністю 30-40 %, що є достатньо високим показником для
введення в культуру *in vitro* деревних рослин.

НУБІП України

НУБІП України

4.2. Мікроклональне розмноження рослин чаю китайського

Технологія мікроклонального розмноження базується на двох основних підходах. Перший включає використання апікальних бруньок, верхівок пагонів та пазушних бруньок в якості експлантів. Такий підхід дозволяє, окрім швидкого отримання вегетативних клонів вихідної рослини, отримати безвірусний посадковий матеріал, а також зберегти генетичні ресурси. Другий підхід оснований на використанні додаткових бруньок, калусної культури та безпосередньо соматичних тканин. Такий підхід доцільно застосовувати для швидкого масового розмноження, або у випадку отримання гібридів генетично несумісних видів рослин. Проте при такому підході використовують сім'ядольні експланти, а це займає досить багато часу для отримання насіння, яке буде використано для введення цих рослин в культуру *in vitro*. Індукція калусогенезу займає приблизно шість місяців з моменту посадки сім'ядольних експлантів до утворення первинного калусу.

В даній роботі для дослідження розмноження чайних рослин через культуру тканин було використано частини пагонів молодих рослин, вирощених в полі. Відомо, що на ефективність мікроклонального розмноження впливає тип вихідного експланту, його походження та доступність протягом року. Так, верхівки пагонів і вузлові сегменти зі сплячими пазушними бруньками ювенільного або дорослого походження рослин, які вирощені у поточному році зазвичай використовуються як експланти для мікророзмноження чаю [45].

Загалом, мікроклональне розмноження складається з чотирьох окремих етапів: ініціація культури клітин, розмноження пагонів, укорінення *in vitro*, вирощування пагонів та акліматизація. Суттєвим фактором, що впливає на ефективність мікроклонального розмноження є склад живильного середовища, наявність в його складі відповідних регуляторів росту.

НУБІП України 28

Існують дані стосовно оптимізації умов мікроклонального розмноження рослин роду *Camelia*. Дані роботи стосувались вивченню впливу типу вихідного експланту, умов культивування на ефективність мікроклонального розмноження, а також сортових відмінностей серед рослин чаю китайського. Отримання пагонів базувалось за застосуванні прямого органогенезу безпосередньо тканинами експланту.

Відомо, що додавання цитокінінів в живильне середовище позитивно впливає на коефіцієнт мікроклонального розмноження рослин. Стосовно рослин роду *Camelia* показано, що додавання в живильне середовище БАП у концентраціях від 1 мг/л до 4 мг/л виявилось найбільш оптимальним для таких видів як *C. japonica*, *C. oleifera*, *C. reticulata* та *C. sasanqua* [41].

Наші дослідження показали, що для рослин *C. sinensis* використання живильного середовища 1/2МС з додаванням 3 мг/л БАП та 0,5 мг/л ГК сприяло більш швидкому проростанню пазушних бруньок (рис. 4.2.1).



Рис. 4.2.1 Ініціація пагонів у рослин чаю китайського на середовищах різного складу: а — 1/2МС+2 мг/л БАП; б — 1/2МС+3 мг/л БАП; в — 1/2МС+3 мг/л БАП+0,5 мг/л ГК.

При використанні живильних середовищ з додаванням 0 мг/л та 2 мг/л БАП не виявлено ініціації пагонів, тоді як наявність в живильному середовищі 3 мг/л БАП сприяло ініціації бруньок. Найкращий результат ініціації бруньок

НУБІП України

показано при використанні комбінації регуляторів росту БАП (3 мг/л) та ГК (0,5 мг/л). Так, додавання в живильне середовище 3 мг/л БАП одночасно з 0,5

мг/л ГК сприяло суттєвому пришвидшенню ініціації бруньок у порівнянні із

середовищем, яке містило тільки БАП без ГК. Отже, додавання ГК в поєднанні з БАП може значно скоротити час, необхідний для ініціації росту пагонів при мікроклональному розмноженні рослин чаю китайського. За

таких умов ініціація пагонів спостерігалась протягом 15 діб.

БАП є синтетичним цитокиніном, який регулює клітинний цикл і поділ клітин, стимулює проліферацію додаткових та адвентивних пагонів, регулює диференціацію та пригнічує коренеутворення [44]. Ініціація пагонів на 15

добу культивування на середовищі із додаванням БАП (3 мг/л) та ГК (0,5 мг/л)

показана на рис. 4.2.2. Усі експланти утворювали нові світло-зелені пагони як

на верхівках, так і збоку від основної бруньки, спостерігли також ініціацію адвентивних пагонів.



Рис. 4.2.2. Ініціація пагонів чаю китайського на живильному середовищі

з додаванням 3 мг/л БАП та 0,5 мг/л ГК.

На наступному етапі бруньки, які утворюються при ініціації, розвиваються в листя, і колір стає зеленим. Розвиток ініціації утворення

листіків на середовищі 1/2МС з додаванням 3 мг/л БАП та 0,5 мг/л ГК після 45

днів культивування показано на рис. 4.3.3.

НУБІП України



Рис. 4.2.3. Розвиток пагонів чаю китайського на середовищі 1/2МС з додаванням 3 мг/л БАП та 0,5 мг/л ГК.

Використання середовища Мурасиге та Скуга зі зменшеним вдвічі вмістом макроелементів сприяло стимулюванню розвитку та росту пагонів чаю китайського протягом 45 днів. Подальше культивування пагонів на середовищі 1/2 МС з додаванням 3 мг/л БАП та 0,5 мг/л ГК дало видовження пагонів та деяких листків на 60 добу вирощування (рис 4.2.4.)

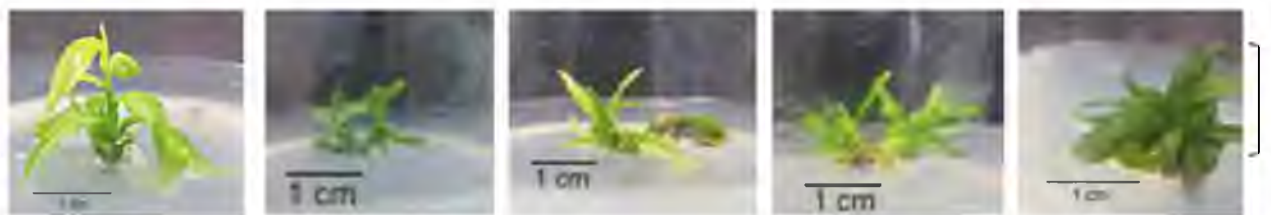


Рис. 4.2.4. Ріст пагонів чаю китайського на середовищі 1/2МС та 3 мг/л БАП і 0,5 мг/л ГК на 60 добу культивування

Наявність в живильному середовищі гіберелевої кислоти сприяла видовженню пагонів, що виявилось більш ефективним у порівнянні із середовищем, яке містило тільки БАП і не містило ГК. Кількість пагонів, що утворились становило 12 ± 2 пагони на експлант.

Таким чином, ефективність мікроклонального розмноження можна суттєво підвищити, використовуючи середовище Мурасиге та Скуга зі зменшеним вдвічі вмістом макроелементів та додаванням комбінації регуляторів росту БАП та ГК.

Відомо, що при мікроклональному розмноженні ініціація пагонів залежить від типу експланта або фізіологічної стадії та генотипу рослини-донора [46]. В нашому дослідженні показано, що використання пазушних

НУБІП України ²¹

бруньок для ініціації росту пагонів в культурі *in vitro* є більш доцільним, ніж використання апікальних бруньок, оскільки можна отримати більшу кількість пагонів. Разом з тим, при використанні сегментів з пазушними бруньками

НУБІП України

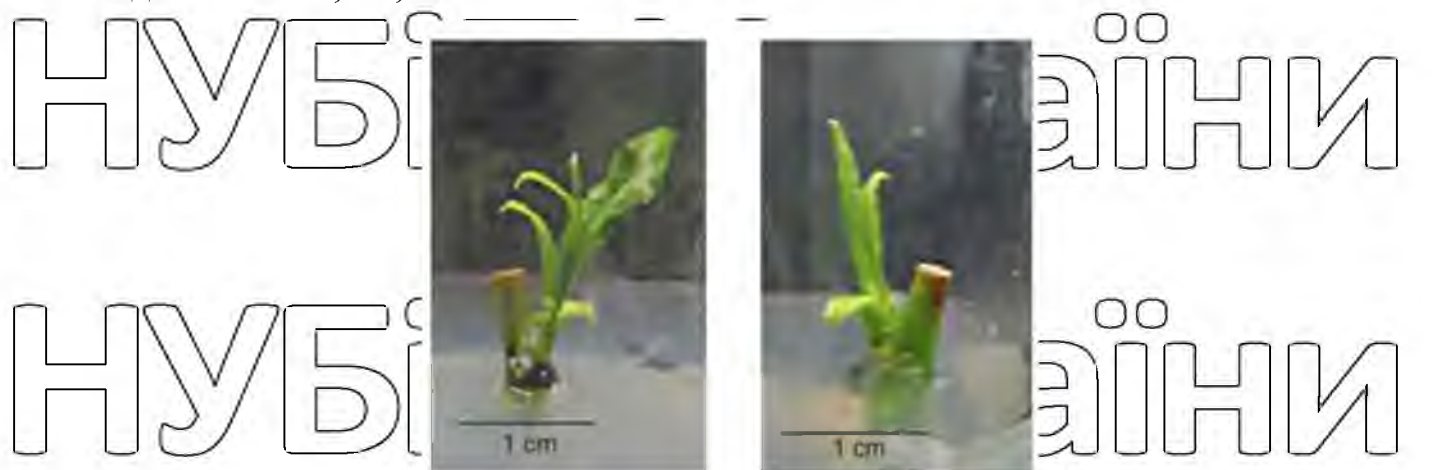
рівень бактеріальної контамінації виявився значно вищим у порівнянні з апікальними бруньками. Зокрема, відсоток інфікування експлантів з пазушними сегментами складав $40 \pm 3\%$, тоді як експлантів з апікальними бруньками $10 \pm 2\%$. Це можна пояснити анатомічною будовою стебла, адже

НУБІП України

пазушка бруньки знаходиться в пазусі листа і обмежена стеблом та черешком листа, це спричиняє підвищену вологість в даній ділянці, що робить її місцем скопчення мікроорганізмів.

НУБІП України

Ініціація росту пагонів з пазушних бруньок спостерігали при культивуванні на живильному середовищі з 3 мг/л БАП та 0,5 мг/л ГК. За наявності цих регуляторів росту сплячі пазушні бруньки переходять в активний стан, розвиваючись у нові молоді зелені пагони (рис. 4.2.5). Пагони, які утворились із пазушних бруньок, мали в середньому 4-5 листків довжиною 1,2-1,8 см.



НУБІП України

Рис. 4.2.5. Розвиток пагонів чаю китайського з пазушних бруньок при культивуванні на живильному середовищі із додаванням 3 мг/л БАП та 0,5 мг/л ГК.

НУБІП України

НУБІП України ³²

Цитокиніни, такі як БАП, часто використовується для стимуляції росту та розвитку. Зазвичай вони сприяють поділу клітин, особливо якщо їх додавати разом з ауксином. У високій концентрації від 1 мг/л до 10 мг/л вони

можуть викликати утворення додаткових пагонів, але утворення коренів, як правило, пригнічується. Вони сприяють формуванню допоміжних пагонів, зменшуючи апікальний спокій. Загалом гібереліни індукують подовження

міжвузлів і ріст рослин або бруньок *in vitro*. Вони також порушують стан спокою ізольованих ембріонів або насіння. Гіберелін зазвичай пригнічує

утворення придаткових коренів [47]. Щоб розмножити висаджені експланти, розмноження проводять за допомогою середовища для розмноження. Два

типи регуляторів росту комбінують для отримання середовища, придатного для розмноження бруньками. Перше середовище було середовищем 1/2 МС з

додаванням 3 мг/л БАП, 5 мг/л ГК і 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти (ІМК). Друге середовище було середовищем 1/2 МС з додаванням 5 мг/л БАП, 1 мг/л

ГК і 0,5 мг/л ІМК. Результати дослідження показали середовище 1/2 МС з додаванням 3 мг/л БАП, 5 мг/л ГК та 0,1 мг/л ІВА дали кращі результати (рис.

4.2.6)



Рис. 4.2.6. Розвиток множинних пагонів чаю китайського при культивуванні на середовищі 1/2 МС з додаванням 3 мг/л БАП, 5 мг/л ГК та 0,1 мг/л ІВА (75 діб культивування).

НУБІП України ²³

Швидкість розмноження прогресивно зростала з концентрацією цитокініну. Адекватна кількість цитокініну, що надходить у поживне середовище, зводить нанівець ефект апікального домінування та посилює

НУБІП України

бічні розгалуження бруньки з пазух листків. Завдяки цьому процесу спляча пазушня брунька відновила свій ріст, в свою чергу, запустила запуск і розвиток пазушних і додаткових бруньок у пазухах листків. Результати,

НУБІП України

отримані тут, можна порівняти з попередні дослідження показали, що бруньки пагонів, отримані на середовищі, що містить BAP (5 мг/л), мають розетку та її височу коливається від 0,5 см до 1,0 см [42].

4.3. Укорінення in vitro пагонів чаю китайського

НУБІП України

Укорінення є одним із важливих етапів мікроклонального розмноження рослин. Відомо, що на процес коренеутворення впливає склад живильного середовища, вміст макроелементів та наявність і концентрація регуляторів росту [48].

НУБІП України

Дослідження показало, що вплив обробки ауксином на укорінення мікропагонів змінювався залежно від концентрації та типу використаного ауксину. У необроблених (контроль) утворення коренів не спостерігалось.

НУБІП України

Мікропагони безперервно культивувалися на середовищі, що містило низьку концентрацію ауксину. Для ефективного укорінення мікропагонів виконували двоступеню процедуру, що призвело до майже відсоткової ефективності

НУБІП України

вкорінення, а метод був високовідтворюваним. Пагони піддавали дії ауксину протягом 10 днів, а потім переносили на середовище, вільне від ауксину.

НУБІП України

При вирощуванні пагонів на ауксині в перші десять днів укорінення не спостерігалось; однак поява коренів була помічена протягом 3-5 днів після перенесення на середовище, що не містить регуляторів росту.

НУБІП України

Серед перевірених ауксинів обробка нафтилоцтовою кислотою (НОК) була кращою порівняно з індолілмасляною (ІМК) та індолілоцтовою кислотою

(ІОК). Коли ІМК, ІОК або НОК застосовували в різних концентраціях, спостерігалися значні відмінності у формуванні придаткових коренів.

Інкубація мікропагонів на середовищі з вмістом 25,0 мкМ ІОК або 175,0 мкМ ІМК протягом 10 днів з подальшим переведенням у середовище 1/2 МС без ауксину призвело до 100% укорінення, тоді як 50,0 мкМ ІАА викликало 92%

укорінення.

НУБІП України

Таблиця 4.3.1.

Вплив регуляторів росту на укорінення пагонів чаю китайського

Регулятор росту	Концентрація	Вживаність пагонів	Відсоток укорінення, %	Кількість коренів на пагін	Довжина накоренів, мм
ІОК	50	100	91,7+/-6,8	11,6+/-1,3	24,0+/-3,2
ІМК	175	100	100+/-0	12,5+/-1,0	8,4+/-0,7
НОК	25	100	100+/-0	11,4+/-0,3	26,3+/-1,3

Окрім ауксинів, кілька інших факторів суттєво вплинули на реакцію укорінення. Температура виявилася фізичним фактором, що впливає на укорінення мікропагонів *in vitro*. Температура 15 °C або нижче, більш високі

(35 °C або вище) температури значно пригнічували загальне вкорінення мікропагонів чаю. Встановлено, що оптимальна температура для найкращого

укорінення становить 25-30 °C.

З точки зору загальної продуктивності 1/2 МС є найбільш оптимальною для укорінення мікропагонів чаю китайського, середовища, що

НУБІП України³⁵
містить 25,0 мкл НОК або 175,0 мкл ІМК протягом 10 днів, з подальшим перенесенням у середовище, вільне від ругцляторів росту рослин.

Серед різних пробних концентрацій (0-400 мМ) виявлено 50 мМ

НУБІП України
сахарози щоб отримати найкращу відповідь укорінення. Хоча укорінення може відбуватися в широкому діапазоні рН (4,0-9,0), рекомендований рН для найкращого загального вкорінення становить 5,5 або 6,0. Відповідь на вкорінення також досліджували в по відношенню до інтенсивності світла (0,5, 12, 20, 30, 40, 50, 75, 100 ммоль м² с), і це сильно вплинуло зі збільшенням інтенсивності. Найкраща реакція з точки зору кількості коренів на пагін і довжини коренів було отримано, коли інтенсивність світла підтримувалася на рівні близько 40 ммоль м² протягом 16 годин, а потім 8 годин темний період.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВИСНОВКИ

26

1. Показано, на мікроклональне розмноження чаю китайського впливає тип експланту, вік вихідної рослини, склад живильного середовища.

2. Визначено, що послідовна обробка експлантів (пазушних меристем) фунгіцидом, 70% етанолом, 0,1% розчином сулеми, а також культивування експлантів на живильному середовищі Мурасиге та Скуга з додаванням 0,5 мг/л БАП та 3 г/л активованого вугілля призводить до отримання асептичних пагонів чаю китайського з ефективністю 30-40 %, що є достатньо високим показником для введення в культуру *in vitro* деревних рослин.

3. Визначено, що ефективність мікроклонального розмноження можна суттєво підвищити, використовуючи середовище Мурасиге та Скуга зі зменшенням вдвічі змістом макроелементів та додаванням комбінації регуляторів росту БАП (3 мг/л) та ГК (0,5 мг/л).

4. Показано, що середовище 1/2 МС з додаванням 3 мг/л БАП, 5 мг/л ГК та 0,1 мг/л ІМК є більш ефективним для мікроклонального розмноження пагонів чаю китайського *in vitro* у порівнянні із середовищем 1/2 МС з додаванням 5 мг/л БАП, 1 мг/л ГК і 0,5 мг/л ІМК.

5. Визначено, що використання пазушних бруньок для мікроклонального розмноження (збільшення кількості пагонів) є більш ефективним, ніж апікальних, проте з більшим відсотком бактеріальної контамінації.

6. Виявлено, що оптимальними умовами для укорінення пагонів чаю китайського *in vitro* є культивування на середовищі 1/2 МС з 25,0 мкМ НОК або 175,0 мкМ ІМК протягом 10 днів з подальшим перенесенням у середовище, вільне від регуляторів росту рослин, вміст сахарози 50 мМ; рН 5,5-6,0; освітлення 40 ммоль/м² s протягом 16 годин, а потім 8 годин темний період.

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Авксентьева О. А. Биотехнология высших растений: культура *in vitro*: навч. метод. посібник / О. А. Авксентьева, В. А. Петренко Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2011. 60 с.
2. Гринько Н. Н. Влияние вируса кольцевой пятнистости на вариабельность фенотипических признаков сортов бамии из мирового генофонда ВИВ / Н. Н. Гринько, В. Н. Туренко / Вісник ХНАУ. 2010. вип 10. С. 19-23;
3. Ahmed A. B. A., Lydia T., Musthafa M. M., Taha M.T., Marikar F M.M.T.. An efficient plant regeneration, detection and identification of secondary metabolites from propagate plants of *Peperomia pellucida* (L.) for mass cultivatione. Modern Phytomorphology. 2020. № 15. P. 6–13.
4. Lengsfeld Ch. Glycosylated Compounds from Okra Inhibit Adhesion of *Helicobacter pylori* to Human Gastric Mucosa / Ch. Lengsfeld, F. Titgemeyer, G. Faller // J. Agric. Food Chem. 2004. Vol. 52, № 6. P. 1495-1503.
5. Lengsfeld Ch. Okra polysaccharides inhibit adhesion of *Campylobacter jejuni* to mucosa isolated from poultry *in vitro* but not *in vivo* / Ch. Lengsfeld, G. Faller, A. Hensel // Animal Feed Science and Technology. 2007. Vol. 135, № 1. P.113–125;
6. Oyelade O.J. Influence of variety on protein, fat contents and some physical characteristics of okra seeds / O.J. Oyelade, B.I.O. Ade-Omowaye , V.F. Adeomi // Journal of Food Engineering. 2003. Vol. 57, № 2. P. 111–114.
7. Khomsug P. Antioxidative Activities and Phenolic Content of Extracts from Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) / P. Khomsug, W. Thongjaroenbuangam,

8. Hollman P. C. H. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability / P. C. H. Hollman, M. B. Katan // Food and Chemical Toxicology. 1999. Vol.37, № 9-10. P. 937-942.

9. Ngoc T. H. Hypolipidemic Effect of Extracts from *Abelmoschus esculentus* L. (Malvaceae) on Tyloxapol-Induced Hyperlipidemia in Mice / T. H. Ngoc, Q. N. Ngoc, A. T. T. Van and N. Vo Phung // Mahidol Univ. Journ. of Pharm. Sciences. 2008. Vol. 35, № 1-4. P. 42-46.

10. Ebrahimzadeh M. A. Antihypoxic and antioxidant activity of *Hibiscus esculentus* seeds / M. A. Ebrahimzadeh, S. F. Nabavi, S. M. Nabavi and B. Eslamib // GRASAS Y ACEITES . 2010. Vol. 61, № 1. P. 30-36.

11. Sabitha V. *In vitro* α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects in aqueous extracts of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench / V. Sabitha, K. Panneerselvam, S. Ramachandran // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2012. Vol. 2, № 1. P. 162-164.

12. Vayssade M. Antiproliferative and Proapoptotic Actions of Okra Pectin on B16F10 Melanoma Cells / M. Vayssade, N. Sengkhampan, R. Verhoef // Phytother. Res. 2010. Vol.24, № 7. P. 982-989.

13. Roy M.K. Regeneration of plants from callus tissue of okra (*Abelmoschus esculentus*) / M.K. Roy and B.S. Mangat // Plant Science. 1989. Vol.60, № 1. P. 77 – 81.

14. Davis D. G. *In vitro* culture of callus tissues and cell suspensions from Okra (*Hibiscus esculentus* L.) And Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) / D. G. Davis, K. E. Dusbabek, and R. A. Hoerauf // In Vitro. 1974. Vol. 9, № 6. P. 395- 398.

НУБІП України ³⁹

15. Mallela R. R. *In Vitro* Plant Regeneration and Genetic Transformation of Okra (*Abelmoscus esculentus* L. Moench) / R. R. Mallela, P. R. Vutukuri, M.

Kanuri // Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. 2009. Vol. 3, №

1. P. 1-6.

НУБІП України

16. Tanda A. S. Antagonism of sesame to the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on Okra in tissue culture / A. S. Tanda, A. S. Atwal and

Y. P. S. Bajaj // Nematologica. 1988. Vol.34, № 1. P. 78-87.

НУБІП України

17. Беседина Е. М. Усовершенствование метода клонального микроразмножения подвоев яблони *in vitro*, автореф. дис. на здобуття наук.

ступеня канд. сільськогосп. наук : спец. 06.01.08 «Плодоводство,

виноградарство» / Беседина Катерина Миколаївна; Северо-Кавказский

Зональний НИИ садов. и виногр. К., 2015. 142 с.

НУБІП України

18. Ромаданова Н.В. Введение в культуру *in vitro* и микрочнолоальноеразмножение перспективных сортов, клоновых подвоев и

дикорастущих форм яблони / Мишустина С.А., Матакова Г.Н., Рахимбаев I.P.,

Кушнарченко С.В. // Казахський національний аграрний університет, - 2013.

НУБІП України

19. Campbell biology / Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Cain [et

al.] 10th Edition : Pearson, 2014. 1279 p.

НУБІП України

20. Ветчинкіна К.М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений, автореф. дис. на здобуття

наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.02.01 «Ботаніка» / Ветчинкіна

Катерина Михайлівна; Учреждеие РАН. К., 2010. 170 с.

НУБІП України

21. Anisuzzaman M. Micropropagation of *Abelmoschus esculentus* L. (Moench.) for disease free plantlets through meristem culture / M. Anisuzzaman, A.

H. Kabir, K. K. Sarker [et al.] // Archives of Phytopathology and Plant Protection.

2010; Vol. 43, № 5. P. 460 – 466.

НУБІП України 40
22. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* 1962. Vol.15, № 3. P. 473 – 497.

НУБІП України
23. Gamborg O. L. The Effects of Amino Acids and Ammonium on the Growth of Plant Cells in Suspension Culture / Oluf L/Gamborg // *Plant Physiol.* 1970. Vol.45, № 4 . P. 372-375.

НУБІП України
24. Guo B. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator / B. Guo, Bilal Haider Abbasi, Amir Zeb // *African Journal of Biotechnology.* 2011. Vol. 10, № 45. P. 8984-9000

НУБІП України
25. Л. О. Рябовол, Я. С. Рябовол Калюсна культура та культура клітинних суспензій. Методичні рекомендації для проведення лабораторно-занять аспірантам з дисципліни «Біотехнологія в селекції і насінництві сільськогосподарських культур» зі спеціальності 201 «Агрономія» освітнього рівня доктор філософії. Умань: УНУС, 2020. 18 с.

НУБІП України
26. Бутенко Р.Г. Біологія кліток вищих рослин in vitro и біотехнології на их основі / Р. Г. Бутенко / М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.

НУБІП України
27. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) / J. Mithila, J. Hall, J. M. R. Victor, P. Saxena // *Plant Cell Reports* January. 2003. Vol. 21, № 5. P. 408-414.

НУБІП України
28. Хареба В. В., Унучко О. О. Технологія вирощування бамії. Плантатор. 2013. № 3 (11). С. 92–93.

НУБІП України
29. Позняк О. В. Селекційний аспект поширення гібіску істівного (бамії) на Чернігівщині. Сучасні аспекти ведення сільського господарства : матеріали ІІ наук.-практ. конф. молодих вчених, 23 січ. 2008

30. S. M. Jain and K. Ishii, Micropropagation of Woody Trees and Fruits (Springer, New Delhi, 2003), pp. 682–683.

31. Tripathi K., Govila O., Warriar R., Ahuja V. Biology of *Abelmoschus esculentus* L. (Okra). Govt. of India, Department of Biotechnology, New Delhi, 2011. 186 P.

32. Gemede HF, Ratta N, Haki GD, Woldegiorgis AZ, Beyene F. Nutritional quality and health benefits of okra (*Abelmoschus esculentus*). A review. J Food Process Technol. 2015. Vol 4, №2. P. 208-215.

33. Manickavasagam M., Subramanyam K., Ishwarya R., Elayaraja D., Ganapathi A. Assessment of factors influencing the tissue culture-independent *Agrobacterium*-mediated in planta genetic transformation of okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]. Plant Cell Tissue Organ Cult 2015. № 123. P. 309-320.

34. Pankaj K., Pandey S., Roy K. Ascorbic and citric acids in combination resolve the problems encountered in micro-propagation of litchi from shoot tips. J Cell Tissue Res 2014. Vol. 14, № 1. - P. 4159-4164.

35. Anisuzzaman M, Kabir A.H, Sarker K.K, Jarin S., Alam M.F. Micropropagation of *Abelmoschus esculentus* L. (Moench.) for disease free plantlets through meristem culture. Arch Phytopathol Plant Prot 2010. Vol. 43, № 5. P. 460-466.

36. Erland L.A., Mahmoud S.S. An efficient method for regeneration of lavandin (*Lavandula × intermedia* cv. 'Grosso'). In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2014. Vol. 50. P. 646-654.

37. Yildirim A.B., Turker A.U. Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and phenolic content comparison of field-grown and in vitro-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray

38. Fardin N., Hedayat Z., Yavar V., Ali Akbar M. In Vitro Propagation of Chrysanthemum: an Overview on its Utility in Mutagenesis and Genetic Transformation Techniques. Agri Res & Tech: Open Access J. 2018. Vol. 15, №4. P. 1-4.

39. Rahman M.D.R., Mohammed F. R. In vitro regeneration of *Paulownia tomentosa* Steud. plants through the induction of adventitious shoots in explants derived from selected mature trees by studying the effect of different plant growth regulators. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture. 2013. Vol. 7. P. 259-268.

40. Borchetia S., Das S. C., Handique P. J., Das S. High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia* spp.) Sci. Hort. 2009. Vol.120, № 4, P. 544–550.

41. Mondal T. K. Breeding and Biotechnology of Tea and Its Wild Species, Springer, New Delhi. 2014. P. 35–36.

42. Taiz L., Zeiger E. Plant Physiology 3rd ed. Sinauer Associates, USA. 2002. P. 1–690.

43. The Plant List. Version 1. Published on the Internet Royal Botanic Gardens, Kew and Missouri Botanical Garden *Camellia sinensis* (L.) Kuntze is an accepted name. 2010.

44. Khaliq A., Rashid H., Quraishi A. Tissue culture studies of tea (*camellia sinensis* L.). Pakistan J. Agric. Res., 2002. Vol. 17, № 3. - P. 297-301.

45. Vieitez A. M., Vieitez M. L., Ballester A., Vieitez E. Micropropagation of *Camellia* spp. High-Tech and Micropropagation III, edited by Y. P. S. Bajaj (Springer, Berlin). 1992. P. 361–387.

46. Bidarigh S., Azarpour E. Study effect of BA hormone levels on length shoot in vitro culture of tea (*Camellia sinensis* L.) JABS. 2013. Vol. 8, № 1, P. 24–28.

47. Gana A. S., The role of synthetic growth hormones in crop multiplication and improvement. Afr. J. Biotechnol. 2010. Vol. 10, № 51, P. 10330–10334.

48. B. Yucesan, A. U. Turker, E. Gurel TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.) // Plant Cell Tiss Organ Culture. – 2007. – 91: 243-250.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України